

n-ACh 受容体活性調節カルシウム (RAMIC) の  
特性と脱感作機構における機能的役割

富山医科薬科大学大学院  
薬学研究科  
医療薬科学専攻  
薬剤薬理学講座薬品作用学教室  
恒 枝 宏 史



# n-ACh 受容体活性調節カルシウム (RAMIC) の 特性と脱感作機構における機能的役割

薬剤薬理学講座(第二)・薬品作用学教室

恒 枝 宏 史

## 謝 辞

本研究は、富山医科薬科大学薬学部 木村正康教授および木村郁子助教授の終始御懇篤なる指導によるものであり、ここに深く感謝申し上げます。また、有益な御助言を頂いた同薬学部 野島浩史助手に感謝致します。

また、試料を提供して頂いた名古屋大学医学部 日高弘義教授、富山医科薬科大学薬学部 三井健一郎助教授、テルアビブ大学 Dr. Asher Kalir, 旭化成に感謝致します。

さらに、実験技術を御指導して頂いた富山医科薬科大学薬学部（現 新技術事業団）近藤高史博士、並びに本研究の一部に協力された出崎克也修士に御礼申し上げます。

1994 年 3 月

## 目 次

緒 論 .....	1
第 I 章 研究目的とその背景 .....	3
I - 1 . 研究目的 .....	
I - 2 . 研究目的の背景 .....	
1 . n-ACh 受容体の構造と機能 .....	3
2 . n-ACh 受容体の脱感作機構 .....	7
3 . 糖尿病態による神経筋シナプス伝達の異常 .....	14
4 . RAMIC の発見 .....	15
第 II 章 実験方法 .....	18
第 III 章 非収縮性細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ (RAMIC) シグナルの特性 .....	
III - 1 . RAMIC の 収縮性 $\text{Ca}^{2+}$ からの独立性 .....	23
要 約 .....	30
III - 2 . n-ACh 受容体による RAMIC シグナルの制御 .....	
1 . 収縮性 $\text{Ca}^{2+}$ 動員に対する脱感作促進剤としての SuCh の効果 .....	31
2 . RAMIC 動員に対する神経筋遮断薬の効果 .....	35
要 約 .....	46
III - 3 . RAMIC シグナルと細胞内情報伝達系との連関 .....	48
要 約 .....	54
第 IV 章 RAMIC シグナルの動員機構 .....	
IV - 1 . 神経筋シナプス後膜における RAMIC の駆動機構 .....	55



IV-2. シナプス前膜の RAMIC への影響 .....	60
要 約 .....	62
第V章 脱感作機構におけるRAMIC動員の役割	
V-1. 糖尿病態による n-ACh 受容体の脱感作促進効果	
1. 糖尿病態における n-ACh 受容体の	
脱感作発現速度の上昇 .....	63
2. 収縮性 $\text{Ca}^{2+}$ 動員に対する神経筋遮断薬の効果の	
糖尿病態による修飾 .....	65
3. 糖尿病態の RAMIC 動員に及ぼす影響 .....	68
要 約 .....	76
V-2. RAMIC 動員によるPKAとPKCの機能的連係 .....	77
要 約 .....	83
第VI章 考察 .....	84
総 括 .....	87
参考文献 .....	88
付録1 略語 .....	105
付録2 試薬リスト .....	106

## 結 論

運動神経と骨格筋との神経筋シナプス間隙にアセチルコリン (ACh) が異常に蓄積すると、ニコチン性アセチルコリン (n-ACh) 受容体は生体防御機構として不活性化、すなわち脱感作する。その脱感作機構には、筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を引き金とするプロテインキナーゼC (PKC) による受容体のリン酸化が介在している可能性が論じられている (Huganir and Greengard, 1990)。一方、運動神経終末に ACh と共存するカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) は脱感作促進物質の一つに挙げられ、その機構には cyclic AMP (cAMP) 依存性プロテインキナーゼ (PKA) による受容体のリン酸化が介在するとされている (Miles et al., 1989)。このように n-ACh 受容体の脱感作機構は  $\text{Ca}^{2+}$  (PKC) 介在説と cAMP (PKA) 介在説とに分かれ、不明のままである。

当研究室ではコリンエステラーゼ阻害剤存在下で神経刺激して、n-ACh 受容体の脱感作が起こりやすい状態を再現した際、収縮を伴わない  $\text{Ca}^{2+}$  動員が発生することを発見している (Kimura et al., 1989)。この非収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  動員は、n-ACh 受容体に密接に関係していることから、受容体活性調節カルシウム (RAMIC: Receptor-Activity Modulating Intracellular Calcium) と名付けた。

本研究は、RAMIC の特性および動員機構を解明し、n-ACh 受容体の脱感作機構における RAMIC 動員の機能的役割を検証することを目的とした。そのため、まずIII章では RAMIC 動員の特性として、RAMIC の収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  からの独立性を検証した。また神経筋遮断薬の効果を検討して、n-ACh 受容体による RAMIC の制御を明らかにした。さらに RAMIC と関連する細胞内情報伝達系を検索し、PKA系が RAMIC 動員過程に深く関わっていることを突き止めた。これを受けて、IV章ではPKA活性化のシグナル駆動機構を追究し、RAMIC 動員の駆動過程の全容を明らかにした。そこでV章では RAMIC 動員の機能的役割が n-ACh 受容体の脱感作促進効果に関連していることを確かめ、さらに二連パルス法によって収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  動員に対する



RAMIC の効果を直接的に検討し、n-ACh 受容体の脱感作機構における P K A と P K C の RAMIC を介した関係機構を実証した。

## 第 I 章 研究目的とその背景

### I - 1 研究目的

神経筋シナプスにおいて、n-ACh 受容体の脱感作が起こりやすい状態になると、筋細胞内に非収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  (RAMIC) が動員される。この RAMIC シグナルの持続時間は骨格筋の収縮反応に比べてかなり長い。したがって、RAMIC は筋細胞内情報伝達系と連係して n-ACh 受容体の脱感作を制御している可能性がある。そこで本研究は、RAMIC 動員の特性および駆動機構を明らかにし、n-ACh 受容体の脱感作機構における RAMIC 動員の機能的役割を解明することを目的とした。

### I - 2 研究目的の背景

n-ACh 受容体は薬物作用機序を解明する上で、基本的かつ重要な作用点となっている。本研究の対象である RAMIC はこの n-ACh 受容体を介して動員される。そこで本章では n-ACh 受容体の構造と機能、および脱感作機構について概説する。また本研究では RAMIC 動員機構の検討を糖尿病態へ展開させたので、糖尿病態における神経筋シナプス伝達異常についても言及する。

#### 1. n-ACh 受容体の構造と機能

n-ACh 受容体は脊椎動物の神経筋接合部をはじめ、自律神経節、中枢神経系および副腎髄質に存在する。骨格筋における n-ACh 受容体は、運動神経の興奮により遊離した神経伝達物質 ACh と結合し、終板電位を発生させる。終板電位の総和が閾値を超えると活動電位が発生し、T管系に伝播する。その結果筋小胞体から  $\text{Ca}^{2+}$  が遊離され、筋収縮が起こる (Fig. 1)。

n-ACh 受容体は分子量 290 kDa の糖タンパク質 (Noda et al., 1983) で、



## E-C coupling

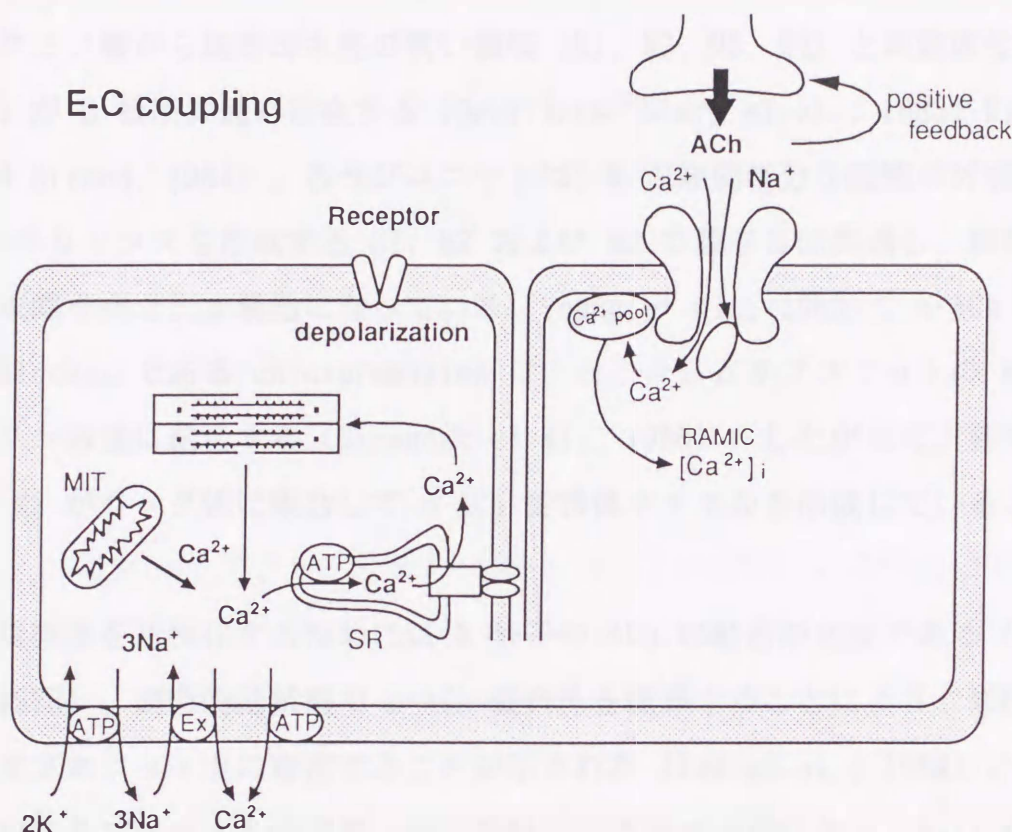


Fig. 1 Scheme of neuromuscular junction (cross section).  $\text{Ca}^{2+}$  is mobilized not only from sarcoplasmic reticulum (SR) but also through n-ACh receptor-channel in skeletal muscle. Excitation-contraction coupling is occurred at foot structure comprised in dihydropyridine receptor and ryanodine receptor bridging transverse tubular and SR.

$\alpha_2\beta\gamma\delta$ あるいは $\alpha_2\beta\epsilon\delta$ という4種のサブユニットからなる5量体である (Raftery et al., 1980)。電子顕微鏡で n-ACh 受容体を観察すると、五つのサブユニットは準対称的に同心円状に寄り集まって円筒形を成しており、受容体中央部の穴がイオンチャンネルに相当する (Brisson and Unwin, 1985)。n-ACh 受容体は膜貫通型のタンパクであり、細胞膜表面からシナプス側に  $0.55\mu\text{m}$ 、細胞質側に  $0.15\mu\text{m}$  突出している。また膜貫通部分は  $1\mu\text{m}$  で、直径は  $0.9\mu\text{m}$  である (Kistler, 1982)。n-ACh 受容体の各サブユニットは cDNA のクローニング、さら

に塩基配列の決定により全一次構造が決定され (Noda et al., 1983)、それを基に、二次および三次構造が推定された。各サブユニットの C 末端側半分には、20-30 残基程度のアミノ酸から成る疎水性の高い領域 (M1, M2, M3, M4) と両親媒性を示す領域 (MA) が 5 箇所共通に存在する (Devillers-Thiery et al., 1983; Finer-Moore and Stroud, 1984)。各サブユニットは、N 末端側半分を細胞の外側に突き出し、 $\alpha$ -ヘリックスを形成する M1, M2 および M3 で膜を 3 回貫通し、細胞質側に MA と C 末端を突き出す構造になっている (Young et al., 1985)。n-ACh 受容体 channel blocker である chlorpromazine は、 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  サブユニットの M2 に存在するセリン残基に結合する (Giraudat et al., 1986)。したがって、各サブユニットの M2 がリング状に集合して n-ACh 受容体チャネルを形成していると考えられている。

n-ACh 受容体を活性化するためには 2 分子の ACh の結合が必要である (Dionne et al., 1978)。競合的拮抗薬で n-ACh 受容体を標識することにより、ACh の結合部位は  $\alpha$  サブユニット上に存在することが示された (Kao et al., 1984)。n-ACh 受容体に対するアゴニストの用量-反応曲線はシグモイド型になり、Hill 係数は 2 である (Katz and Thesleff, 1957)。このように n-ACh 受容体への結合には正の協同性がある。

n-ACh 受容体はイオンチャネルとして機能しており (Nelson et al., 1980)、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  および僅かな量の  $\text{Ca}^{2+}$  を透過させ (Takeuchi and Takeuchi, 1960; Decker and Dani, 1990)、終板電位を発生させる。パッチクランプ法により 1 分子の n-ACh 受容体チャネルを通る電流を測定してみると、受容体チャネルは基本的には“開”と“閉”の二つの状態をとることがわかる (Neher and Sakmann, 1976)。分化した神経筋シナプスに局在する n-ACh 受容体チャネルは、未分化あるいは除神経した骨格筋に拡散して存在する受容体チャネルとは、電気生理学的に異なる性質を示す (Mishina et al., 1986; Witzemann et al., 1987)。両者の差異はサブユニットの一部が置換されていることに由来する。すなわち前者の受容体は  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  サブユニットから成るのに対し、後者は  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  サブユニットから成っている



(Takai et al., 1985)。このことは、 $\gamma$  および  $\varepsilon$  サブユニットの mRNA 発現量が神経支配に対して異なる依存性を示すことから、裏付けられている (Witzemann et al., 1987)。

n-ACh 受容体は1分子あたり 60 個の  $\text{Ca}^{2+}$  と結合する (Chang and Neumann, 1976)。ACh の結合により 2-6 個の  $\text{Ca}^{2+}$  が解離することから、ACh 結合部位も  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位の一つである可能性がある (Chang and Neumann, 1976)。しかし  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位は ACh および受容体-channel blocker の結合部位とは異なるという報告もあり (Oswald, 1983)、いまだに確立されていない。

n-ACh 受容体には、アスパラギン残基に結合する N-グリコシド型の糖鎖が存在する (Nomoto et al., 1986)。 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  および  $\delta$  のサブユニットにはそれぞれ 1, 1, 2 および 3 本の糖鎖が結合している (Nomoto et al., 1986)。これらの糖鎖は、その結合部位が N 末端側半分に偏っていることから、細胞外に存在すると考えられる (三品, 1986)。受容体タンパクへの糖鎖の結合を阻害すると、n-ACh 受容体の発現量が減少する (Merlie et al., 1982)。しかし精製した n-ACh 受容体から糖鎖を除去しても、 $\alpha$ -bungarotoxin の結合性には変化がみられない (野元ら, 1986)。糖鎖は n-ACh 受容体の生合成の過程に必要であると考えられている。

一方、神経型の n-ACh 受容体も骨格筋型の n-ACh 受容体と類似した構造を持っている。すなわち4つないし5つのサブユニットが集合して非特異的カチオンチャネルを形成している。サブユニットは ACh 結合部位を持つ  $\alpha$  と、結合能の低い  $\beta$  に大別される。各サブユニットとも数種のサブタイプ ( $\alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 5, \alpha 6, \alpha 7, \alpha 8, \beta 2, \beta 3, \beta 4$ ) が見いだされている (Deneris et al., 1991)。いずれの組み合わせが実在しているのかは不明であるが、卵母細胞の遺伝子発現系を用いた実験により一種類あるいは二種類のサブタイプだけで受容体として機能し得ることが示された (Berg et al., 1989; Couturier et al., 1990)。この点は骨格筋型 n-ACh 受容体とは異なる。特に高い活性を示す組み合わせには  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 2$ ,  $\alpha 7$  などがある。

神経型 n-ACh 受容体チャネルの  $\text{Ca}^{2+}$  透過性は、骨格筋型に比べ 10-100 倍高い

(Seguela et al., 1993)。また外液  $\text{Ca}^{2+}$  による修飾も神経型と骨格筋型 n-ACh 受容体とは異なる。高濃度 (mM オーダー) の  $\text{Ca}^{2+}$  存在下では、ACh に対する骨格筋型 n-ACh 受容体の電流応答は減少するが、神経型 n-ACh 受容体チャネルの開口頻度は増加する (Verino et al., 1992; Mülle et al., 1992)。このように、神経型 n-ACh 受容体のアロステリック部位に  $\text{Ca}^{2+}$  が結合することにより、受容体は活性化状態に移行するらしい。

神経型 n-ACh 受容体の活性化機構は cAMP を介する細胞内情報伝達系によって修飾されることが知られている。ニワトリ毛様体神経節細胞あるいはウシ副腎クローム親和性細胞に cAMP を投与すると、ACh に対する電流応答が増大する (Berg et al., 1989; Higgins and Berg, 1988)。このとき膜表面の n-ACh 受容体数は変化していない。また n-ACh 受容体チャネルの開口時間、開口頻度、イオンの選択性 (逆転電位) およびアゴニストの親和性にも変化はみられない。これらのことから、神経節細胞膜表面には多数の不活性型の n-ACh 受容体が存在し、cAMP 刺激後に不活性型から活性型への変換が起こると結論されている。

## 2. n-ACh 受容体の脱感作機構

神経筋シナプスにおいて、アゴニストが n-ACh 受容体に繰り返しまたは長時間作用すると、アゴニストが存在しているにもかかわらず、n-ACh 受容体は脱感作 (desensitization) を起こしてシナプス伝達効率を低下させる。このとき受容体のコンフォメーションは脱感作型に変化する (Unwin et al., 1988)。n-ACh 受容体は脱感作を起こすために必要な要素をすべてタンパク分子中に保持している。したがって、脂質二重層に再構成された n-ACh 受容体 (Labarca et al., 1984)、卵母細胞にサブユニットの mRNA を注入して発現させた n-ACh 受容体 (Mishina et al., 1984)、線維芽細胞のゲノムに受容体サブユニットの cDNA を組み込み膜上に発現させた n-ACh 受容体はすべて脱感作を起こし得る (Claudio et al., 1987)。このように神経伝達物質および薬物が n-ACh 受容体に直接作用することによって発現さ



せた脱感作を同種脱感作 (homologous desensitization) と呼び、異なる受容体に作用して n-ACh 受容体を間接的に不活性化する異種脱感作 (heterologous desensitization) と区別している (Ochoa et al., 1992)。後者の例としては、神経筋シナプスの伝達物質であるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) やアデノシンがそれぞれの受容体の活性化を介して n-ACh 受容体の脱感作を促進する機構 (Mulle et al., 1988; Pitchford et al., 1992) が挙げられる。

n-ACh 受容体の脱感作の発現過程および回復過程は速度論的に詳しく解析されており、その詳細を以下に示す。また生理的条件下で n-ACh 受容体の脱感作を引き起こすために如何なる促進機構が介在するとされているかを概説する。

## 2-1 脱感作の発現過程

n-ACh 受容体の同種脱感作の発現速度と強度はいずれもアゴニストの濃度に依存しており、濃度が高いほど脱感作は促進する (Adams, 1975)。アゴニストの脱感作発現能は、受容体の活性化における固有活性とは平行しない。受容体の脱感作は速度論的に次の四つに分類される (Ochoa et al., 1989)。1) 1 msec 以内で起こる脱感作 (ultrafast desensitization)、2) 数 msec から数 sec で起こる脱感作 (fast desensitization)、3) 数 sec から数 min で起こる脱感作 (slow desensitization) および 4) 数 min から数 hr で起こる脱感作 (ultraslow desensitization) である。Slow と ultraslow desensitization の区別には一線を成すものはないが、ultraslow desensitization は、共有結合による修飾や second messenger を介する間接的な効果および down regulation による受容体数の減少を含んでいると考えられている。

アゴニストが n-ACh 受容体の "isosteric 部位" ( $K_d \sim 800 \mu M$ ) に結合すると ultrafast desensitization が起こる (Udganonkar and Hess, 1987)。この結合は電位依存的で、過分極側で促進される (Takeyasu et al., 1983)。Ultrafast desensitization は受容体チャネルの開口に匹敵する速度で起こるため、パッチクランプ法を用いてはじめて観察できる (Colquhoun and Sakmann, 1981)。しかし、

その生理的意義に関しては不明のままである。

Fast および slow desensitization に関しては、1950 年代から研究が進められている。アゴニストを微小電極に詰めて電気泳動的に短時間でカエルの筋終板に投与すると、fast desensitization が観察される (Katz and Thesleff, 1957)。しかし、同じ標本を用いてアゴニストを灌流法により投与すると、slow desensitization が観察される (Adams, 1975)。そこで Feltz と Trautmann (1982) はアゴニストを速い灌流法により投与した結果、脱感作が二相性であることを明らかにし、上記の矛盾を解決した。また神経筋接合部では外部からアゴニストを投与しなくても、神経を 25 msec 以下の間隔で刺激することによって受容体を脱感作させ得る (Magleby and Pallotta, 1981)。脱感作時の単一チャンネル電流をパッチクランプ法により測定してみると、コンダクタンスは変化していない (Sakmann et al., 1980)。このことから脱感作は受容体チャンネルを通るイオンの透過性には影響せず、全か無の法則にしたがってチャンネルを閉じることが示された。また脱感作状態では、単一チャンネル電流は数十個集まって burst 状になり、さらに burst はまとまって cluster を形成する (Sakmann et al., 1980)。この burst 間および cluster 間の間隔は脱感作の発現過程の二つの相と関連があると考えられている。脱感作状態にある n-ACh 受容体に対するアゴニストの結合を生化学的に測定すると、低親和性の結合 ( $K_d \sim 1 \mu M$ ) と、高親和性の結合 ( $K_d \sim 3 nM$ ) があり、それぞれ fast と slow desensitization に対応していることが明らかになっている (Boyd and Cohen, 1980)。さらに蛍光を発生するアゴニスト Dns- $C_6$ -Cho を n-ACh 受容体に作用させることにより、脱感作発現中に低親和性型 (fast desensitization) から高親和性型 (slow desensitization) へコンフォメーションが変化していることが示された (Heidmann and Changeux, 1979)。またアゴニストがない状態でも n-ACh 受容体の 20 % は脱感作状態 (slow desensitization) にある (Boyd and Cohen, 1980)。

一般に n-ACh 受容体は、アゴニストにより活性化し、それに引き続き fast desensitization を経て slow desensitization を起こすと考えられている



(Neubig et al., 1982)。しかし "methaphilic なアンタゴニスト" は n-ACh 受容体を活性化させずに低親和性型から高親和性型へ変化させる (Rang and Ritter, 1970)。このことは n-ACh 受容体の脱感作過程において活性化状態を経る必要はないことを示唆する。また n-ACh 受容体の活性化と脱感作は、別個の ACh 結合部位を持つ独立した過程であるという報告もある (Dunn and Raftery, 1982)。

n-ACh 受容体-closed channel blocker は脱感作を促進する薬物として知られている (Albuquerque et al., 1988)。この channel blocker はアゴニストによる受容体の fast desensitization (Carp et al., 1983) および slow desensitization (Sine and Taylor, 1982) をそれぞれ促進する。その結果、受容体の構造が変化して、アゴニストは高親和性を示すようになる。脂質膜に再構成した n-ACh 受容体においても同様の結果が得られたことから (Medrano et al., 1987)、これらの薬物は n-ACh 受容体に直接作用して同種脱感作 (homologous desensitization) を惹起することが確認された。n-ACh 受容体におけるこれらの薬物の結合部位は二つに分類されている。1) イオンチャネル内に局在する高親和性部位と 2) 脂質-タンパク表面に 10-30 個存在する低親和性部位である (Heidmann et al., 1983; Changeux et al., 1984)。前者に channel blocker が作用すると、アゴニスト非依存的に脱感作が起こる。また後者に作用すると、アゴニストによる脱感作が促進される (Heidmann and Changeux, 1979; Boyd and Cohen, 1984)。

アゴニストによる n-ACh 受容体の脱感作の発現速度は、外液  $Ca^{2+}$  濃度に依存して上昇することが報告されている (Parsons, 1969; Manthey, 1970)。その際、外液  $Ca^{2+}$  は n-ACh 受容体チャネルを介して流入し、シナプス後膜の内側から受容体に作用していると考えられ (Miledi, 1980; Parsons et al., 1973; Nastuk and Parsons, 1970)、さらにこのことは Nojima et al. (1992) によって実証された。細胞内で増加した  $Ca^{2+}$  は、脱感作発現過程の二つの相のうち slow desensitization を選択的に促進することが明らかになっている (Chesnut, 1983; Boyd, 1987)。Caffeine は n-ACh 受容体の脱感作に影響しないことから、筋小胞体からの  $Ca^{2+}$  遊離は脱感作に関与していないと考えられる (Magazanik and

Vyskocil, 1970)。また  $\text{Ca}^{2+}$  はアゴニストの協同性に影響すること無く、親和性を増加する (Cohen et al., 1974)。 $\text{Ca}^{2+}$  以外の 2 価および 3 価の陽イオンも受容体の脱感作を促進し (Lambert and Parsons, 1970)、アゴニストの親和性を増加する (Cohen et al., 1974)。しかし  $\text{Ca}^{2+}$  は脱感作には影響しないという報告もあり (Anywyl and Narahashi, 1980; Fiekers et al., 1980)、 $\text{Ca}^{2+}$  は homologous desensitization の調節因子であっても必須因子ではないと考えられている。

一方、n-ACh 受容体のリン酸化は異種脱感作 (heterologous desensitization) を媒介する主要な因子とされている。n-ACh 受容体をリン酸化する酵素としてプロテインキナーゼA (PKA)、プロテインキナーゼC (PKC) およびチロシンキナーゼが報告されている: PKAは n-ACh 受容体の  $\gamma$  および  $\delta$  サブユニットのセリン残基を (Huganir and Greengard, 1983)、PKCは  $\alpha$  および  $\delta$  サブユニットのセリン残基を (Safran et al., 1987)、チロシンキナーゼは  $\beta$ ,  $\gamma$  および  $\delta$  サブユニットのチロシン残基を (Huganir et al., 1984) それぞれリン酸化する。受容体がこれらの内因性の酵素によってリン酸化されると、fast desensitization の速度が上昇する (Hopfield et al., 1988; Huganir et al., 1986)。しかし、リン酸化は slow desensitization には影響しない (Huganir et al., 1986)。これに対して、cAMP (PKA) 系の脱感作への関与を否定する論文もある (Grassi et al., 1987; Wagoner and Pallotta, 1988)。また筋細胞内のPKAの活性化により n-ACh 受容体チャネル活性が増大するという報告もある (Zani et al., 1986; Lu et al., 1993)。Ferrer-Montiel et al. (1991) は、これらの相反する cAMP 系の効果がアゴニストの濃度に依存して生じることを指摘した。すなわちPKAによる n-ACh 受容体のリン酸化は、比較的低濃度のアゴニスト存在下では受容体の活性化を助長し、高濃度のアゴニスト存在下では受容体の脱感作を促進するのである。

ホスホリパーゼ  $A_2$  の活性は  $\text{Ca}^{2+}$ 、G蛋白質およびPKCによって調節されている (Axelrod et al., 1988)。Torpedo 電気器官膜においてホスホリパーゼ  $A_2$  は n-ACh 受容体の脱感作を促進する (Andreassen et al., 1979)。ホスホリパーゼ



A<sub>2</sub>の産生物質であるアラキドン酸およびリゾ-リン脂質は n-ACh 受容体チャネル活性を抑制するが、受容体の脱感作には影響しない。n-ACh 受容体の脱感作発現速度は細胞膜を構成する脂質の組成に依存して変化するので (Sunshine and McNamee, 1992)、ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>による脱感作促進効果は受容体の膜環境の修飾によるものと考えられる。

その他、n-ACh 受容体を取り巻く環境の変化によっても脱感作は修飾される。脱感作の発現は温度が低いほど遅くなる (Magazanik and Vyskocil, 1975)。また脱感作の発現は脱分極状態では遅くなり、過分極状態では速くなる (Magazanik and Vyskocil, 1970)。脱感作発現過程に対する pH の影響はこれまで slow desensitization においてのみ検討されている。ACh 灌流法を用いて酸性条件下におけるマウス骨格筋 n-ACh 受容体の脱感作の速度を測定すると、少なくとも slow desensitization が促進されている (Li and McNamee, 1992)。しかしアルカリ性条件下では脱感作の速度に変化は起こらない。また脱感作の pH 感受性は n-ACh 受容体の  $\beta$ -サブユニットに依存している。

## 2-2 脱感作の回復過程

n-ACh 受容体の脱感作からの回復過程は発現過程と同様に二つの指数関数で表される (Felts and Trautman, 1982)。速い回復過程の時定数は数 msec であり、遅い相は数 min である。しかし発現過程における fast および slow desensitization の割合と回復過程の二つの相の割合とは異なる。また回復過程の二つの相の割合はアゴニストの投与時間によって決まり、アゴニストの種類、濃度および脱感作の強度には無関係である。そのため、低濃度のアゴニストを用いても長時間作用させると遅い相の割合が増え、脱感作からの回復が遅くなる。これらのことから、脱感作からの回復は脱感作発現とは全く独立した過程であるといえる。

脱感作発現の促進因子は、回復過程に対してかなり異なる作用を示す。Chlorpromazine などの closed channel blocker は脱感作の回復過程には全く影響しない (Magazanik and Vyskocil, 1975)。細胞内 Ca<sup>2+</sup> は脱感作からの回復を遅

らせ、脱感作状態を維持する (Chesnut, 1983)。その際、二つの相の回復速度は共に減少する。n-ACh 受容体のリン酸化は脱感作からの回復過程には影響しない (Hardwick et al., 1991)。しかしPKAおよびPKCの活性を阻害すると脱感作からの回復の度合が減少する。したがって、脱感作からの完全な回復には n-ACh 受容体あるいはその関連タンパクのリン酸化が必要であると考えられている。

### 2-3 生理的機能としての脱感作

一般に、受容体の脱感作機構は生理的条件下では機能していないとされている。しかし神経筋接合部において運動神経を 33 Hz 以上の頻度で刺激することによって n-ACh 受容体の脱感作を引き起こすことができる (Magleby and Pallotta, 1981)。さらにコリンエステラーゼが阻害され、シナプス間隙に ACh が貯留した状態においては、5-10 Hz 程度の低頻度刺激によって容易に脱感作を起こし得る (Magleby and Pallotta, 1981; Giniatullin et al., 1989)。

n-ACh 受容体の脱感作が  $\text{Ca}^{2+}$  やリン酸化などの因子によって促進されることは既に述べた。これらの因子を制御する生理的機構として、現在独立した二つの説が提唱されている。その一つは、ACh 自身が惹起する同種脱感作機構 (homologous desensitization) である。その機構には、PKCによる n-ACh 受容体のリン酸化が関与していると考えられている (Eusebi et al., 1987b)。培養骨格筋において ACh が受容体を活性化するとき、細胞内でイノシトールリン脂質代謝が活性化する (Adamo et al., 1985)。またラット坐骨神経を高頻度で電気刺激したとき、下肢筋の収縮にともないPKCは膜へ移行する (Richter et al., 1987; Cleland et al., 1989)。さらに外液  $\text{Ca}^{2+}$  存在下においてのみ、受容体アゴニストの carbachol 刺激で n-ACh 受容体のリン酸化が起こる。そのリン酸化パターンは PKC活性化剤によるものと類似している (Ross et al., 1988; Huganir and Greengard, 1990)。これらの結果から ACh 刺激による外液  $\text{Ca}^{2+}$  流入がPKCを活性化し、n-ACh 受容体のリン酸化を引き起こしていることが示唆されている。

二つ目の説は、運動神経終末に存在する CGRP (Takami et al., 1985) が惹起す



る異種脱感作機構 (heterologous desensitization) である。神経の興奮にともない ACh と共に遊離した CGRP がアデニレートシクラーゼを活性化すると (Laufer and Changeux, 1987)、細胞内 cAMP の濃度が上昇する (Miles et al., 1989)。その結果、活性化した PKA が n-ACh 受容体をリン酸化するため、受容体の脱感作が促進する (Mulle et al., 1988)。

Mulle et al. (1988) は n-ACh 受容体の脱感作促進機構における CGRP と  $\text{Ca}^{2+}$  系との関連を検討している。CGRP はマウス培養骨格筋細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を一過性に上昇させる。このとき細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  をキレートしても CGRP の脱感作促進効果は阻害されない。したがって CGRP は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  を介さずに脱感作を促進し得る、と彼らは結論している。しかし、この結果はかなり高濃度の CGRP の効果を検討したものであり、生理的濃度下ではむしろ CGRP は  $\text{Ca}^{2+}$  を介して脱感作を促進する可能性も残されている。

### 3. 糖尿病態による神経筋シナプス伝達の異常

糖尿病態は、糖質、タンパク質および脂質の代謝異常状態であり、多くの場合、合併症を引き起こす。糖尿病性神経障害は糖尿病慢性合併症のうち最も頻度の高いものの一つである。糖尿病態の神経筋シナプスにおいても、運動神経の伝導速度の遅延や ACh 遊離量の減少 (Kimura et al., 1993; Constantini et al., 1987)、骨格筋の形態学的、生化学的、電気生理学的な異常が観察される (Ganguly et al., 1986; Chao et al., 1976; Grossie, 1982)。また、筋細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  制御機構においても変化が生じる：糖尿病態において筋線維膜の  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプおよび  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  交換の活性や筋小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプ活性は上昇し (Ganguly et al., 1986; Taira et al., 1991)、筋線維膜の  $\text{Ca}^{2+}$  channel 数は増大する (Lee and Dhalla, 1992)。さらに糖尿病態筋において、1)  $\text{Ca}^{2+}$  活動電位の振幅および持続時間の減少 (Kimura et al., 1988b)、2) 筋直接刺激による収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  動員の外液  $\text{Ca}^{2+}$  濃度依存性の低下 (Kimura et al., 1990a)、3)  $\text{Ca}^{2+}$  依存性中性プロテアーゼ活

性の上昇 (Kobayashi et al., 1989)、4) Ca 含量の増加 (Nakagawa et al., 1989)、などの報告がなされており、糖尿病態では筋細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が異常に上昇していると考えられる。

糖尿病性神経障害の成因は依然として未解決のままである。しかも神経側と筋側の病態異変は上記のようにそれぞれ独立に論じられており、神経筋接合部の異常にはあまり注意が払われていない。Kimura et al. (1988a) は脱分極作用をもつ神経筋遮断薬の suxamethonium (succinylcholine: SuCh) とマウス後肢骨格筋ミクロソーム分画との結合様式を検討したところ、正常筋では正の協同性を示すのに対し、糖尿病態筋では負の協同性を示すことを見いだした。そして膜を含めた n-ACh 受容体機構に異常が生じていると結論している。さらに kimura et al. (1986) は n-ACh 受容体に対する神経筋遮断薬の感受性の糖尿病態における変化を検討している。それによると、糖尿病態では SuCh による ACh 電位抑制作用の感受性は増大するが、競合的拮抗薬の (+)-tubocurarine および  $\alpha$ -bungarotoxin による抑制作用の感受性は変化しない。単収縮の抑制作用においても同様の変化が観察される

(Muroi et al., 1989)。脱感作促進作用を持つ和漢薬の蒼朮成分  $\beta$ -eudesmol は、糖尿病態による SuCh の作用の増強をさらに促進する (Muroi et al., 1989)。コリンエステラーゼ活性は正常筋と糖尿病態筋とで差がみられない (Matsui et al., 1990)。したがって、糖尿病態では n-ACh 受容体の脱感作が亢進している可能性がある。

以上の報告より、糖尿病態において筋細胞内に蓄積した  $\text{Ca}^{2+}$  が n-ACh 受容体の脱感作を亢進させ、その結果神経筋シナプス伝達の異常を引き起こしていると考えられる。

#### 4. RAMICの発見

骨格筋において細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  は主に収縮・弛緩を制御する因子として理解されてきた。興奮-収縮連関を介して筋小胞体から遊離される  $\text{Ca}^{2+}$  がその役割を担ってい



ることは周知の事実である。ところが横隔膜神経筋標本において脱感作促進剤としての SuCh が細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  transient を筋収縮よりも高い感度で抑制することから、収縮には直接結びつかない  $\text{Ca}^{2+}$  動員機構の存在を当研究室では予測していた (Kimura et al., 1990b)。そして低濃度のコリンエステラーゼ阻害剤存在下で神経刺激して脱感作の起こりやすい状態を再現したとき、収縮性の  $\text{Ca}^{2+}$  とは別に、持続時間の長い非収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient が発生することを発見し得た (Fig. 2; Kimura et al., 1989)。この非収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient は外液  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に依存し

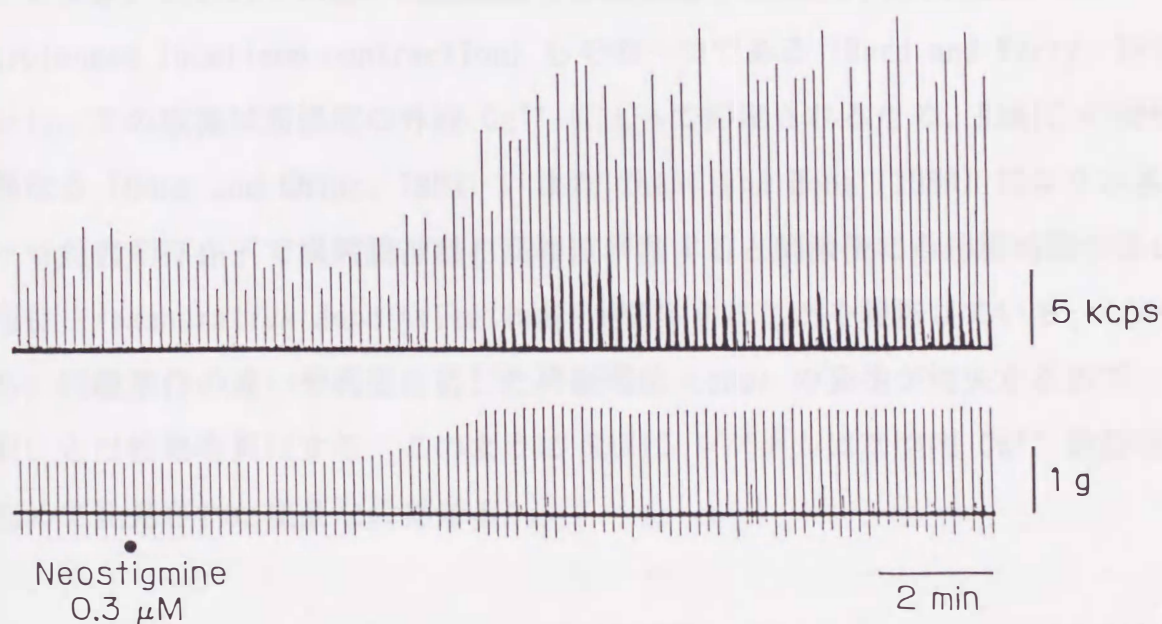


Fig. 2 Typical data showing the effect of neostigmine ( $0.3\mu\text{M}$ ) on  $\text{Ca}^{2+}$ -aequorin luminescence ( $\text{Ca}^{2+}$  transient, upper) and twitch tension (lower) in nerve-stimulated diaphragm muscle of mice. The nutrient solution containing neostigmine was continuously perfused from the time point represented by the closed circle (Kimura et al., 1989).

て変化する。また(+)-tubocurarine は、収縮を抑制する濃度より 10 倍も低濃度において非収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient を抑制するが、ムスカリン性 ACh 受容体の拮抗薬である atropine や  $\text{Ca}^{2+}$  拮抗薬の nitrendipine は影響しない。したがって n-ACh 受容体チャネルを介する  $\text{Ca}^{2+}$  流入に密接に関連していることが明らかになっている (Fig. 1)。しかし非収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  動員機構の詳細なメカニズムに関しては不明のままである。非収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient の動員総量は収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient より大量であるにも拘らず収縮を引き起こさないことから、n-ACh 受容体の活性を調節する役割を果たしていると考えられる。そこでこの  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルを RAMIC (receptor-activity modulating intracellular calcium) と命名した。

RAMIC 発見以前にも、コリンエステラーゼ阻害剤存在下で RAMIC と類似した波形を示す現象が知られていた。横隔膜筋の終板部位で観察される持続的な収縮 (prolonged localized contraction) もその一つである (Burd and Ferry, 1987)。しかし、この収縮は高濃度の外液  $\text{Ca}^{2+}$  によって抑制されるため、RAMIC の特性とは異なる (Hong and Chang, 1993)。また Chang and Hong (1986) はコリンエステラーゼ阻害剤存在下で横隔膜神経を高頻度刺激すると刺激後にも持続時間の長い終板電位 (regenerative depolarization) が発生することを報告している。しかしこれも、刺激条件の違いや刺激に応じた終板電位 (epp) の発生が消失する点で RAMIC とは性格を異にする。このように RAMIC シグナルは細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態を介して初めて発見された現象なのである。

以上、n-ACh 受容体の構造と機能、脱感作機構、病態修飾および RAMIC 動員についての現在までの知見を概説した。骨格筋において、 $\text{Ca}^{2+}$  は活性化と不活性化の両面に関与している。そこで、n-ACh 受容体の脱感作が起こりやすくなった状態における筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態を検討することにより、 $\text{Ca}^{2+}$  による脱感作機構を解明できる可能性がある。ここに本研究の意義が存在する。



## 第 II 章 実験方法

### (1) 実験標本

ddY系マウス（7-9 週齢、体重28-42 g, 雄）を断頭、瀉血後開腹し、片側横隔膜を横隔膜神経、腱および肋骨を付けたまま摘出した。修正 Krebs 液（mM: NaCl 122、KCl 5.9、CaCl<sub>2</sub> 2.5、MgCl<sub>2</sub> 1.2、NaHCO<sub>3</sub> 15.5、glucose 11.5）中で、幅約 10 mm の横隔膜神経-横隔膜標本を作成し、実験に用いた。

糖尿病態マウスとしては、正常 ddY マウス（4 週齢）の尾静脈内に streptozotocin (STZ, 150 mg/kg) あるいは alloxan (85 mg/kg) を単回投与し（0.1 ml/10 g）、4-5 週経過後に使用した。マウスの血糖値は glucose analyzer (Type II, Beckman) を用いて glucose oxidase 法により測定した。

### (2) 筋収縮張力測定法

Thermo-module（小松電子）により温められた銅版の上に反応槽を固定し、混合ガス（95%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>）で飽和した 36℃ の修正 Krebs 液を 1.5 ml/min の速度で灌流した。そして Fig. 3 で示すように、神経筋標本の4端をピンで固定した。横隔膜切片の腱には予め糸を結んでおき、それを isometric transducer (model SB-1T-H, 日本光電) に導いた後、静止張力として 200 mg を負荷した。1 mm 離れた一對の白金電極を栄養液中に浸し、横隔膜神経を掛けた。Electric stimulator (3F46, 三栄)、isolator (5361, 三栄) を介して白金電極に電圧を加え、神経を電気刺激（0.1 Hz, 0.1 msec duration, supramaximal voltage）した。刺激電圧はオシロスコープ（DPO-6001, ダイヤマメディカル）でモニターした。このとき発生する横隔膜筋の収縮を等尺性張力変化としてとらえ、transducer を介して carrier amplifier（RP-3, 日本光電）で増幅し polygraph (type 8K20, 三栄) に記録した。

### (3) Aequorin 発光測定法

細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度測定法には、1) Ca<sup>2+</sup> 電極法、2) Ca<sup>2+</sup> 感受性色素による吸光

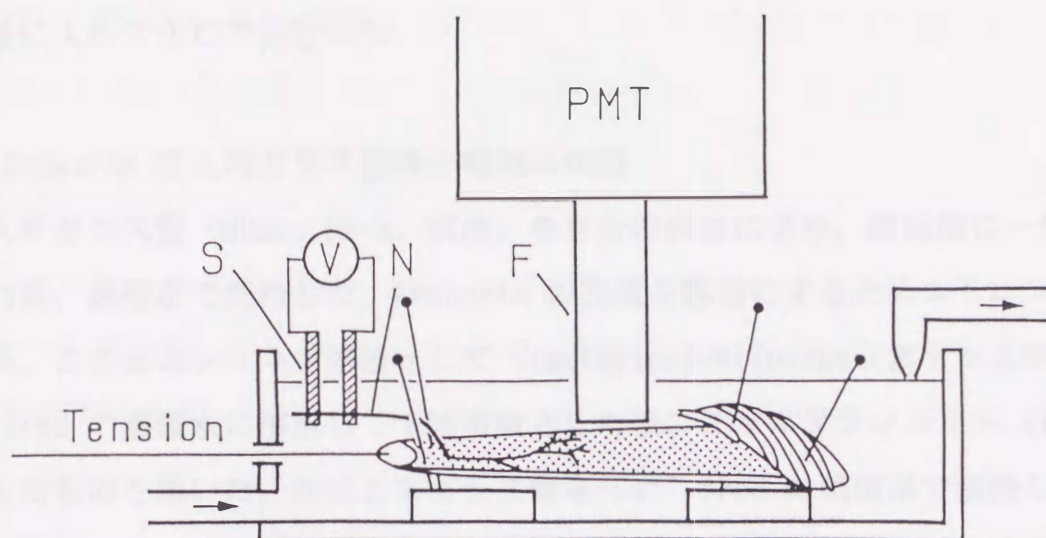


Fig. 3 Apparatus used to measure aequorin signals and tension. The nutrient solution perfused the preparation from left to right (see arrows). The four corners of a muscle stripe were pinned to rubber plates; The left end was connected to an isometric transducer. The phrenic nerve was stimulated through a pair of platinum wire electrodes 1 mm apart (S). Aequorin luminescence was directed through an optical fiber (F) onto a photomultiplier tube (PTM) whose output was led to a photon counter.

度変化測定法、3)  $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光色素法、および 4)  $\text{Ca}^{2+}$  感受性発光タンパク (aequorin) 法がある。高い時間分解能が要求される骨格筋の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度測定には aequorin 法が最も適している。当研究室では既に aequorin 法を用い、筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化および張力変化を同時に測定する方法を確立している (Kimura et al., 1985)。

### 3-1 Aequorin 溶液の調製

Chelex-100 (Bio. Rad. Laboratories, 50-100 mesh) を詰めたカラムに再蒸留水を通し、 $\text{Ca}^{2+}$  を除去した。そして、 $5\mu\text{M}$  EDTA 溶液とした後、aequorin (Mayo



Clinic および和光純薬) を溶解した。この aequorin 溶液 (1 mg/ml: 150 mM KCl, 5 mM HEPES, pH 7.45) をミリポアフィルター (0.05  $\mu$ m) に通した後、ポリエチレン容器に入れて 4°C で保存した。

### 3-2 Aequorin 注入用ガラス管微小電極の作製

芯入りガラス管 (90mm, GD-2, 成茂) を半分の長さに切り、濃硫酸に一昼夜以上浸した後、蒸留水で洗浄した。Aequorin の充填を容易にするためシリコン溶液で処理する。このときシリコン溶液として dimethylpolysiloxane (富士システムズ) を  $\text{Ca}^{2+}$ -free の蒸留水に溶解して 1% 溶液とした後、ミリポアフィルター (0.45  $\mu$ m) を通したものをを用いた。次にこのガラス管を  $\text{Ca}^{2+}$ -free の蒸留水で洗浄した後、シリコンを固定する目的で乾熱乾燥した (約 80°C, 20 min)。さらに 5  $\mu$ M EDTA を含む  $\text{Ca}^{2+}$ -free の蒸留水に浸した後、自然乾燥させた。最後に、得られたガラス管をプラー (成茂) で引くことにより、aequorin 注入用微小電極 (抵抗 4-6 M $\Omega$ ) を作製した。

### 3-3 Aequorin の細胞内圧注入

ガラス管微小電極の先端に aequorin 溶液 (約 1  $\mu$ l) を充填し、白金線により電気的接触を保った。顕微鏡観察下でマイクロマニピュレーターを操作し、微小電極を筋細胞内に刺入した。これは、膜電位を microelectrode amplifier (MEZ-8101, 日本光電) を介してオシロスコープでモニターすることにより確認できた。そして窒素ガスを用いて微小電極の末端側から加圧 (5-6 atm, 2 sec) し、細胞内に aequorin 溶液を圧注入した。この操作を繰り返し、各標本の 40-50 本の筋線維に aequorin を負荷した。

### 3-4 Aequorin 発光測定法

横隔膜神経を電気刺激したとき、細胞内で一過性に増加する  $\text{Ca}^{2+}$  と結合した aequorin の発光 ( $\text{Ca}^{2+}$  transient) を光ファイバー (直径 3 mm, 菱美プラスチック

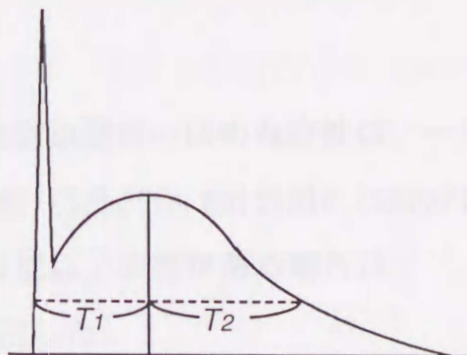
ク)を通して光電子増倍管 (Model R464, 浜松ホトニクス) に導き、photon counter (一部改良した Model C767, 浜松ホトニクス) で測定し、recorder (type 8K20, 三栄) に記録した。同時に aequorin 発光の振幅の変化は、張力変化とともに、FFT analyzer (SM-2701, 岩通) により測定した。

### 3-5 薬物投与法

RAMIC シグナルに対する種々の薬物効果を検討するため、neostigmine 投与前に横隔膜筋を薬物処理した。前処理する薬物が細胞膜の外側に作用点を持つ場合、あるいは細胞膜を透過して作用し得る場合、修正 Krebs 液に溶解し、灌流した。細胞質内に作用点を持ち、かつ膜を透過しない薬物に関しては aequorin 溶液に溶解し、細胞内に注入した。その他、ボツリヌス毒素は腹腔内に、百日咳毒素は尾静脈内に投与し作用させた。

### 3-6 データの定量法

RAMIC シグナルを定量するため、30回 (5分間) の刺激により得られた波形を、signal processor (7T07A, 三栄) で加算平均処理し、X-Y recorder (type 8U11, 三栄) に記録した。そして RAMIC 動員の総量、振幅および持続時間に分けて解析した：まず動員総量は波形の面積を測定することにより定量した。面積測定には digitizer (KD3200, グラフテック) を用いた。RAMIC の動員総量および振幅は、neostigmine 投与前の収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient を 100% としたときの相対値で表した。また RAMIC シグナルの持続時間は、発生開始から、ピーク値の  $1/e$  に減衰するまでの時間とした。RAMIC の持続時間をさらに詳しく解析する場合は、左図のように発生開始からピーク値に達するまでの時間 ( $T_1$ ) と、ピーク値から  $1/e$  の大きさに減衰するまでの時間 ( $T_2$ ) とに分けて定量した。





一方、neostigmine 非存在下において収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient に対する神経筋遮断薬の効果を検討した実験では、シグナルの振幅測定のために FFT analyzer を使用した。そして刺激により得られたデータを6個（1分間）ずつ平均し、薬物投与前の反応を 100% としたときの相対値で表すことにより薬物の効果を定量した。

#### (4) ACh 電位測定法

電気泳動的に投与した ACh が惹起する膜電位変化（ACh 電位）を細胞内微小電極法により測定した。膜電位記録用ガラス管微小電極に 3 M KCl を充填し、Ag-AgCl 電極により電氣的接触を保った。顕微鏡観察下でマニピュレーターを操作し、横隔膜筋の終板部位に微小電極を刺入した。このときオシロスコープ（VC-9, 日本光電）で微小終板電位（mepp）の発生を確認した。次に 2 M ACh を充填した刺激用電極（抵抗 15-20  $\text{M}\Omega$ ）の先端を記録用電極の刺入位置に近づけた。Electric stimulator（日本光電）、micro-iontophoresis unit（DRI-25, ダイアメディカル）を介して刺激用電極に陽電流（2 msec, 10-50 nA）を流すことにより ACh を電気泳動的に放出した。このとき発生した ACh 電位を microelectric amplifier（DPZ-16A, ダイアメディカル）で増幅し、カセットデータレコーダー（XR-5000, TEAC）に記録した。刺激電極の位置は ACh 電位の立ち上がり時間が 10-20 msec になるように調節した。また ACh 電位の振幅が 8 mV になるように刺激電位にかかる電荷量を調節した。刺激電圧には ACh の漏出を防ぐため、常に電極に逆電流（約 5 nA）を流した。

#### (5) 統計学的処理

結果は平均値±標準誤差で示した。対照群と薬物処置群の間の有意性は、一元配置分散分析（one-way ANOVA）をした後、多重比較（Scheffe multiple-comparison test）で判定した。ただし、各群のデータ数に2倍以上の差がある場合は、Student の unpaired t-test により有意差を検定した。

### 第Ⅲ章 非収縮性細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ (RAMIC) シグナルの特性

#### Ⅲ-1 RAMICの収縮性 $\text{Ca}^{2+}$ からの独立性

骨格筋において細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  は収縮・弛緩を直接制御する役割を果たしている。そのため興奮-収縮連関に携わる筋小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構のみが重要視されてきた。ところがコリンエステラーゼ阻害剤存在下でマウス横隔膜筋を神経刺激したところ、収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  とは別に非収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  (RAMIC) が終板部位に動員される (Kimura et al., 1989)。RAMIC は n-ACh 受容体の活性化後、外液  $\text{Ca}^{2+}$  濃度依存的に動員されるが、その動員過程は不明のままである。そこで本章では、RAMIC と筋小胞体由来の  $\text{Ca}^{2+}$  との違いを追究した。

Neostigmine ( $0.3\mu\text{M}$ ) 存在下で横隔膜筋を神経刺激すると、収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient が 2-3 倍に増加し、同時に持続時間の長い RAMIC シグナルが発生した。Geographutoxin II は神経の  $\text{Na}^+$  チャネルに対する親和性が低く、骨格筋の  $\text{Na}^+$  チャネルのみを抑制する (Ohizumi et al., 1986)。Geographutoxin II ( $0.3\mu\text{M}$ ) を投与すると収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient は完全に抑制されるが、RAMIC は影響を受けなかった (Fig. 4)。したがって、RAMIC 動員には活動電位の発生は関与しておらず、収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  とは独立した機構で動員されることが明らかになった。

Formamide は細胞膜の興奮性に影響することなく興奮-収縮連関を阻害する (Castillo and De Motta, 1978)。Formamide (2 M) を投与すると直ちに収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient が非可逆的に抑制された (Fig. 5)。その後 neostigmine ( $0.3\mu\text{M}$ ) を投与すると RAMIC のみが動員された。このことから、活動電位発生後の興奮-収縮連関は収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  動員には不可欠であるが、RAMIC の動員には関与していないことが示された。



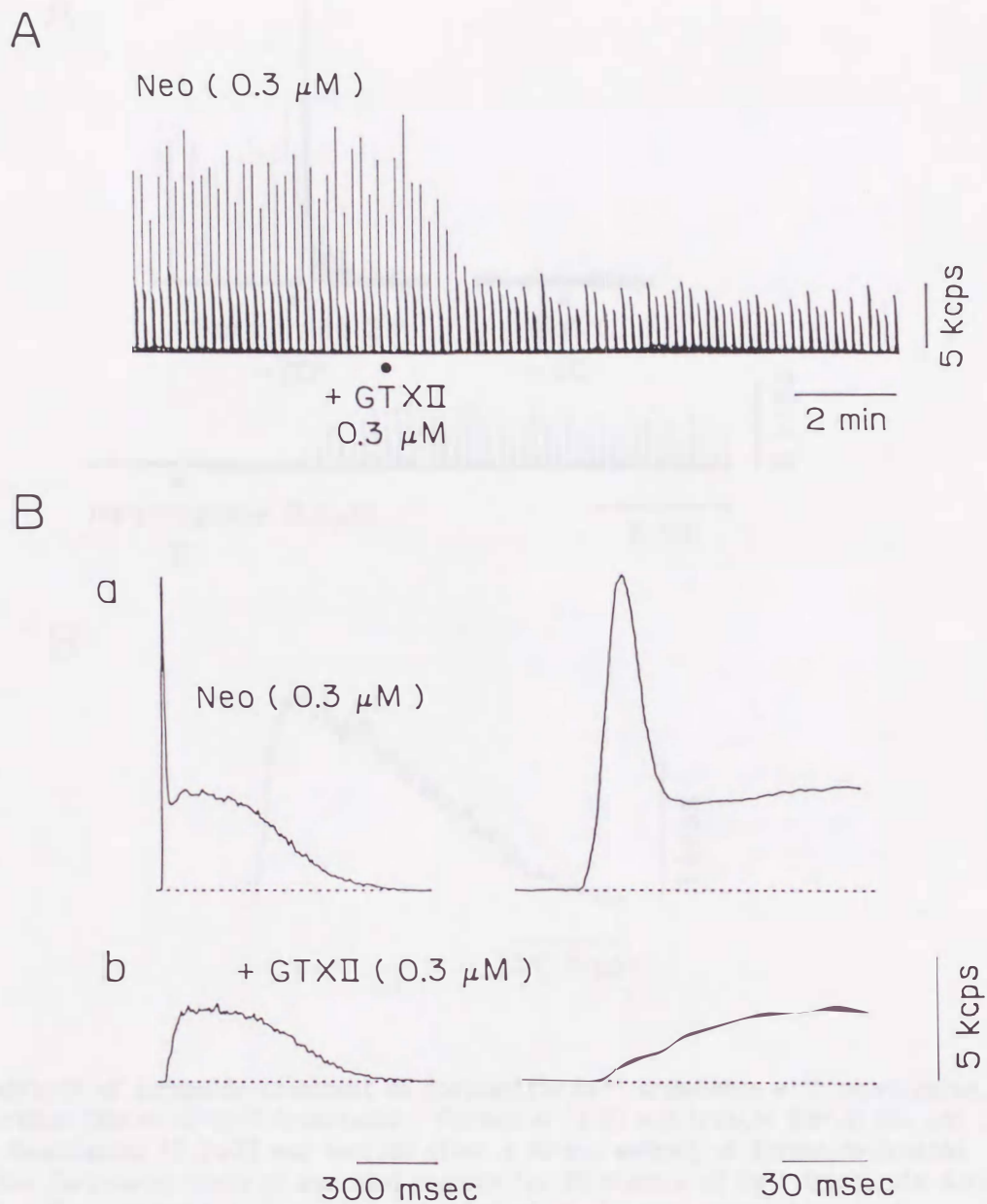


Fig. 4 Effects of geographutoxin II (GTX II) on contractile  $\text{Ca}^{2+}$  transient and noncontractile  $\text{Ca}^{2+}$  transient (RAMIC). The large, rapid increase in  $\text{Ca}^{2+}$  represents the contractile transients, and the slower prolonged increase represents the RAMIC-signal. GTX II ( $0.3\mu\text{M}$ ) was added 15 min after the application of neostigmine (Neo,  $0.3\mu\text{M}$ ). A, typical slow traces of  $\text{Ca}^{2+}$  transients. B, typical fast traces of averaged records for 30 signals of  $\text{Ca}^{2+}$  transient during (a) 5 to 0 min before and (b) 3 to 8 min after the application of GTX II in the presence of neostigmine. Right traces are traces of the early responses of the left ones expanded 10-fold.

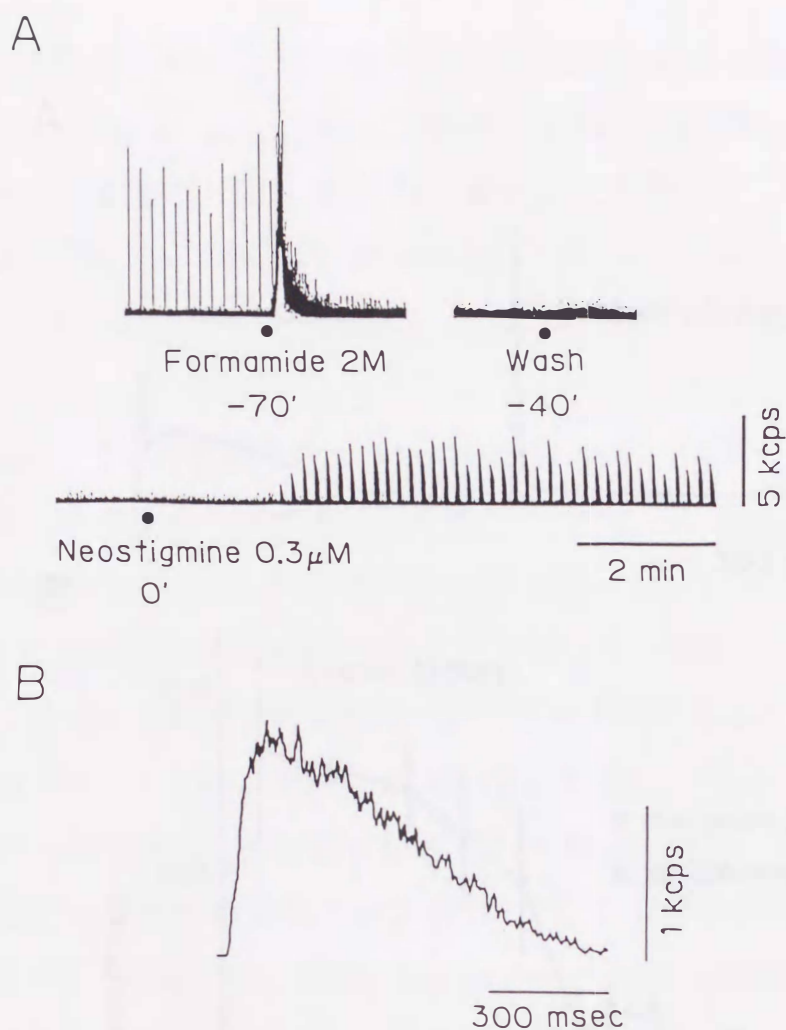
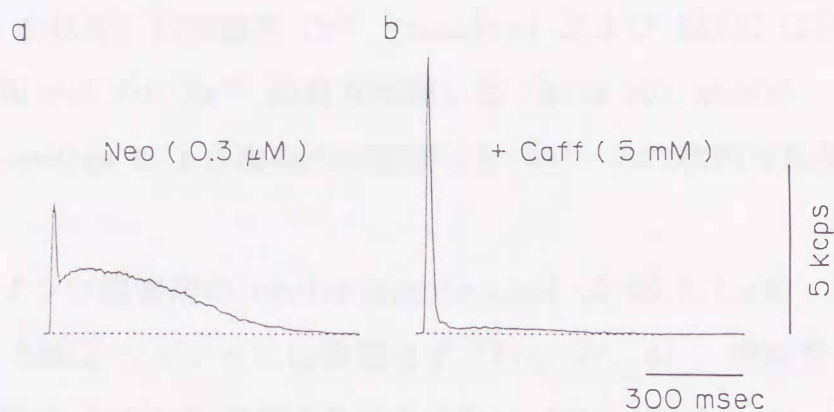


Fig. 5 The effects of formamide-treatment on contractile  $\text{Ca}^{2+}$  transients with neostigmine. A: typical slow-sweep traces of  $\text{Ca}^{2+}$  transients. Formamide (2 M) was treated for 30 min and then washed out. Neostigmine ( $0.3 \mu\text{M}$ ) was applied after a 40-min washout of formamide-treated muscle. B: the fast-sweep trace of averaged records for 30 signals of  $\text{Ca}^{2+}$  transients during 10-15 min after the application of neostigmine obtained in the same preparation in A.

筋小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離を促進する caffeine (5 mM) は、収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient および単収縮を 2 倍に増強するが、逆に RAMIC を抑制した (Fig. 6)。Caffeine の効果を定量的に検討してみると、低濃度 (0.25-5 mM) で収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient を増大し、高濃度 (7.5-20 mM) で抑制した。一方、RAMIC シグナルに対しては、2-10 mM において抑制作用のみを示した。これらのことから筋小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  遊離は RAMIC 動員には関与していないといえる。



A



B

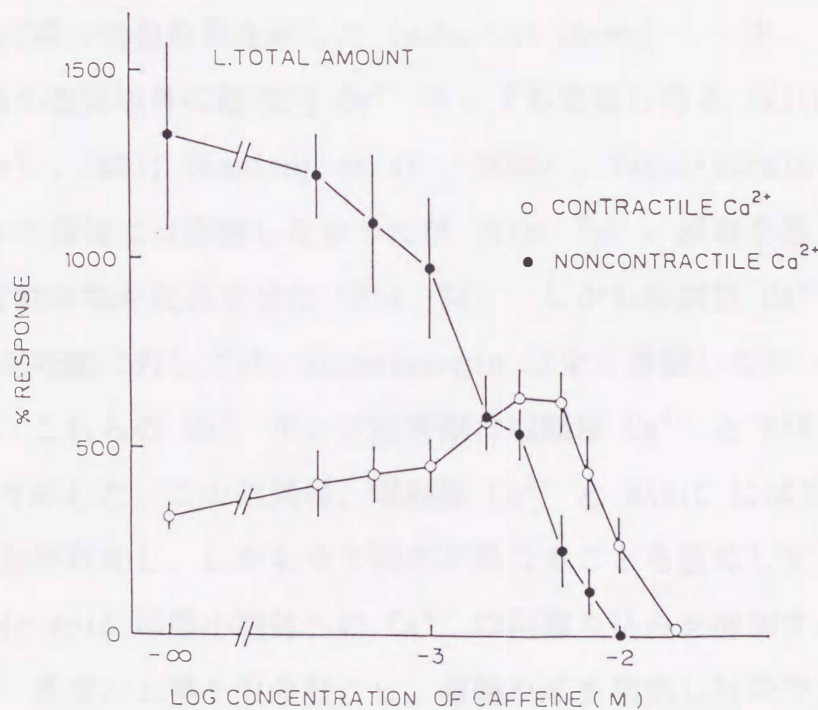


Fig. 6 Effect of caffeine (Caff) on  $\text{Ca}^{2+}$  transients in the presence of neostigmine ( $0.3\mu\text{M}$ ). A: typical fast-sweep trace of averaged records for 30 signals of  $\text{Ca}^{2+}$  transients during 5 min. a: 10-15 min after application of neostigmine; and b: 5-10 min after the addition of caffeine (5 mM). Neostigmine solution was continuously perfused. B: log concentration-response curves of caffeine for total amount of contractile  $\text{Ca}^{2+}$  transient (O) and noncontractile  $\text{Ca}^{2+}$  transients (RAMIC; ●) after the neostigmine exposure. The total amounts of either contractile  $\text{Ca}^{2+}$  transients or RAMIC were expressed as percentages of the contractile transients obtained during 5 min before neostigmine was applied. Caffeine was added in increased amounts every 5 min after a 15-min application of neostigmine, and the averaged records of 6 signals during the last 1 min in every 5 min were analyzed.

Ryanodine は筋小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルを開口固定することによって  $\text{Ca}^{2+}$  遊離を促進させる (Hwang et al., 1987)。Neostigmine 投与直後、ryanodine ( $0.3\mu\text{M}$ , 30 min 前処理) は収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient および RAMIC には影響しなかったが、徐々に両タイプの  $\text{Ca}^{2+}$  動員を抑制した (data not shown)。この非特異的な抑制は、ryanodine により細胞内に蓄積した  $\text{Ca}^{2+}$  の二次的な効果であると考えられる。

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプ阻害剤の cyclopiazonic acid ( $0.05\text{--}0.1\mu\text{M}$ ) (Seidler et al., 1989) は RAMIC シグナルには影響せず (Fig. 7c, d)、収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient を選択的に 1.4-1.6 倍増大させた (Fig. 7b)。Cyclopiazonic acid は単収縮に対しても同様の増強効果を示した (data not shown)。一方、thapsigargin は筋小胞体以外の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプも阻害し得る (Kirby et al., 1992; Lytton et al., 1991; Thastrup et al., 1990)。Thapsigargin ( $0.3\text{--}1\mu\text{M}$ ) は RAMIC シグナルの振幅には影響しなかったが (Fig. 7c)、減衰を遅らせることにより RAMIC の持続時間を延長させた (Fig. 7d)。しかし収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient および単収縮に対しては、thapsigargin は全く影響しなかった (Fig. 7b)。このように、これらの  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプ阻害剤は収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  と RAMIC 動員に対して異なる選択性を示した。この結果は、収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  と RAMIC にはそれぞれ独立した  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵部位が存在し、しかもその局在が異なることを意味している。おそらく cyclopiazonic acid は筋小胞体への  $\text{Ca}^{2+}$  の再取り込みを抑制することによって細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を引き起こし、収縮反応を増強したのであろう。また thapsigargin は筋小胞体とは異なる  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵部位への RAMIC の再取り込みを抑制した結果 RAMIC シグナルの持続時間を延長したと考えられる。

Aequorin を横隔膜神経筋標本の肋骨の近傍 (終板から 3 mm 離れた位置) に注入すると、neostigmine 存在下で神経を電気刺激しても RAMIC は観察されなかった (data not shown)。このことは RAMIC 動員が終板に局限していることを示している。したがって、RAMIC は n-ACh 受容体チャネルを介して流入する  $\text{Ca}^{2+}$  が引き金となって動員されていると考えられる。



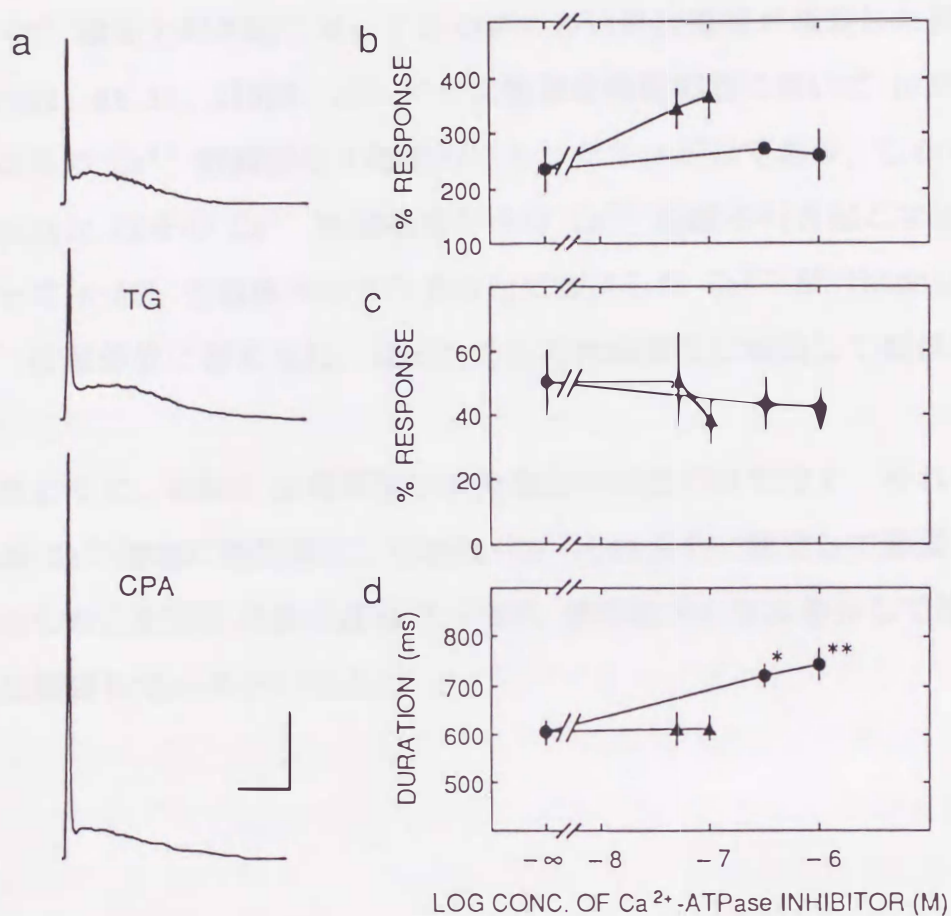


Fig. 7 Effects of thapsigargin (TG) and cyclopiazonic acid (CPA) on  $\text{Ca}^{2+}$  transients in the presence of 0.3  $\mu\text{M}$  neostigmine. Left: typical traces of  $\text{Ca}^{2+}$  transients (a) in the absence (upper) and presence of 1  $\mu\text{M}$  TG (middle) or 0.1  $\mu\text{M}$  CPA (lower). Ordinate and abscissa calibration bars represent 100% and 0.3 s, respectively. Right: log concentration-response curves of TG (●) and CPA (▲) on contractile (b: peak amplitude) and noncontractile  $\text{Ca}^{2+}$  transients (c: peak amplitude, d: duration). See the methods for details of normalization procedures.  $n = 4-8$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; significantly different from the control response to neostigmine alone, by one-way ANOVA (Scheffe multiple-comparison test).

上述のように、thapsigargin-感受性の  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵部位が RAMIC の回収過程に関与していることは明らかになったが、動員過程においても関与している可能性については未だ推測の域を出ていない。Miledi et al. (1980) の報告によると、カエル骨格筋の終板部位に ACh を局所投与したとき終板電流の発生に少し遅れて局所的な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇が起こり、このシグナルは終板電流が減衰した後も持続する。また Grassi et al. (1993) は、マウス培養骨格筋細胞において n-ACh 受容体は筋小胞体以外の  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵部位と機能的にカップリングしており、しかも thapsigargin はその  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵部位からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離を引き起こすと述べている。したがって n-ACh 受容体チャネルを介して流入した  $\text{Ca}^{2+}$  が thapsigargin-感受性の  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵部位に蓄えられ、RAMIC として終板部位に局限して動員されると考えられる。

以上のように、RAMIC は骨格筋の活動電位の伝播だけでなく、それに続く筋小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離に無関係で、収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  とは完全に独立して動員されることを明らかにした。RAMIC の動員過程は n-ACh 受容体チャネルを介して流入する  $\text{Ca}^{2+}$  に密接に関係しているといえる。



## 【要約】

- (1) Aequorin を注入したマウス横隔膜神経筋標本を用い、neostigmine ( $0.3\mu\text{M}$ ) 存在下で観察される RAMIC 動員の特性を検討した。
- (2) 骨格筋  $\text{Na}^+$ -channel blocker の geographutoxin II ( $0.3\mu\text{M}$ ) は収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient を完全に抑制したが、RAMIC 動員には影響しなかった。
- (3) 興奮-収縮連関を阻害する formamide (2 M) は収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient のみを抑制した。
- (4) 筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  遊離促進剤の caffeine (2-5 mM) は収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient を増大させたが、逆に RAMIC 動員を抑制した。
- (5) 筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプ阻害剤 cyclopiazonic acid ( $0.1\mu\text{M}$ ) は収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient を増大させたが、RAMIC には作用しなかった。
- (6) 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプ阻害剤 thapsigargin ( $1\mu\text{M}$ ) は収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient には影響しなかったが、RAMIC の持続時間を延長した。
- (7) 以上の結果より RAMIC は骨格筋の活動電位の伝播だけでなく、それに続く筋小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離に無関係であり、収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  とは完全に独立した機構で動員されていることが明らかになった。そして n-ACh 受容体チャネルを介して流入した  $\text{Ca}^{2+}$  はシナプス後膜直下の  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵部位に蓄えられ、RAMIC として遊離される機構が想定された。

### Ⅲ-2 n-ACh 受容体によるRAMICシグナルの制御

Ⅲ-1で、RAMICはn-ACh受容体チャンネルを介して流入する $\text{Ca}^{2+}$ と密接な関係であることが示された。そこで、n-ACh受容体によるRAMIC動員の制御を明らかにするため、神経筋遮断薬の効果を検討した。その際、競合的拮抗薬、脱分極性遮断薬、受容体-channel blockerなどを用い、神経筋遮断薬の作用機序の違いによって生じる変化の差異に特に注目した。尚、ここで用いたSuChの神経筋遮断作用機序は完全には解明されていないので、RAMICに対する効果を検討するのに先立ち、その作用機序を検証した。

#### 1. 収縮性 $\text{Ca}^{2+}$ 動員に対する脱感作促進剤としてのSuChの効果

SuChによる神経筋遮断作用は脱分極中に発達し、再分極した後も持続するため脱分極性遮断では説明できない(Thesleff, 1955)。またSuChはn-ACh受容体のopen channel block作用を示さない(Lambert et al., 1983)。一方、SuChはシナプス前膜のn-ACh受容体にも作用してAChの遊離を抑制するが(Standaert and Adams, 1965)、収縮を抑制するよりも高濃度が必要であるため(Kimura et al., 1991b)、神経筋遮断作用の主因ではないと考えられる(Colquhoun, 1986)。SuChは単一チャンネル電流をburst状に変化させ、ACh電位の減衰速度を増加させることから(Kimura et al., 1991c)、n-ACh受容体の機能を脱感作性に抑制すると考えられている。そこでSuChによるシナプスの遮断作用の本体は脱感作の促進であることを確固たるものにするため、SuChおよびpancuroniumの神経筋遮断作用に対する三つのタイプのn-ACh受容体-channel blocker(chlorpromazine: closed channel blocker, bupivacaine: open channel blocker, phencyclidine および $\beta$ -eudesmol: open and closed channel blocker)の効果と比較検討した。尚、この検討はneostigmine非存在下で行なったため、RAMICシグナルは観察されない。

SuChを累積的に投与すると、収縮性 $\text{Ca}^{2+}$ transientは低濃度( $1.3\text{--}5\mu\text{M}$ )にお



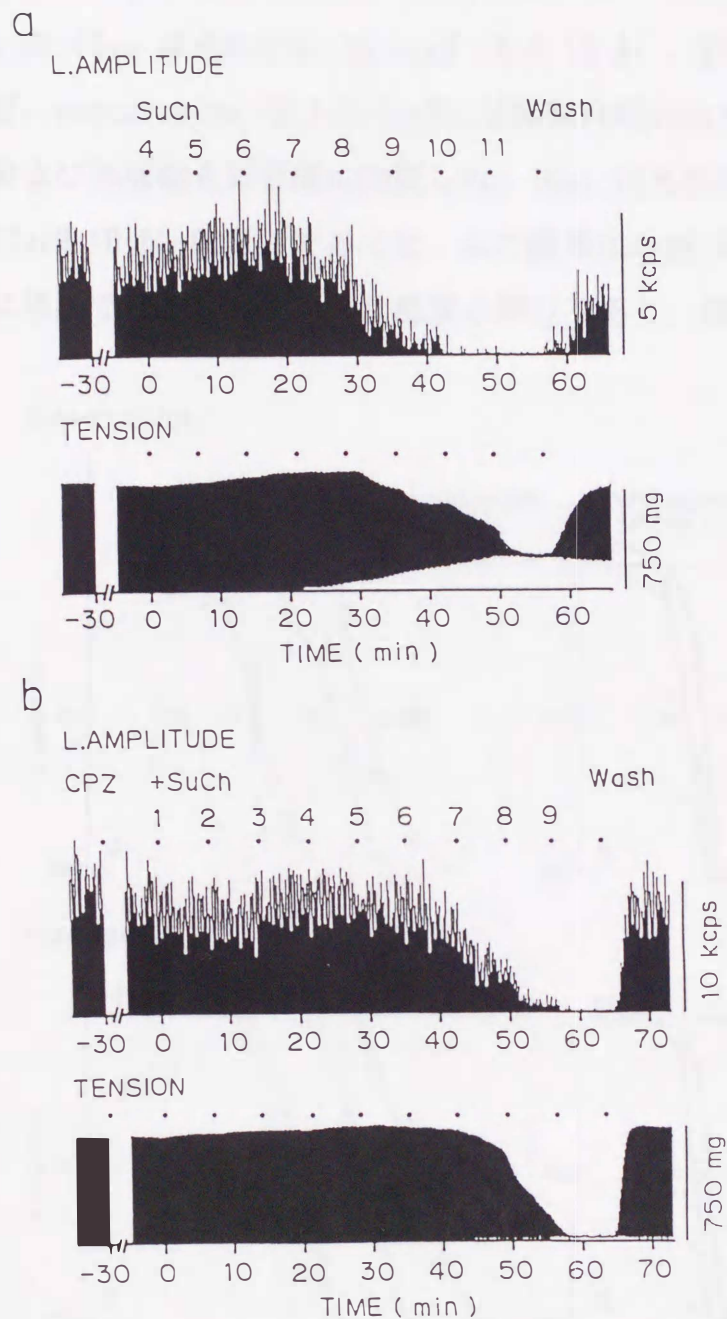


Fig. 8 Typical recording showing the enhancing effect of chlorpromazine (CPZ) on succinylcholine (SuCh)-induced inhibition of luminescence amplitude (L.AMPLITUDE, upper trace) and twitch tension (lower trace) in phrenic nerve-diaphragm muscles of mice. a, control. SuCh was administered cumulatively at 7-min intervals. The increase in resting tension indicates SuCh-induced contracture. b, after preincubation with  $3\mu\text{M}$  CPZ for 30 min, SuCh was administered. Concentrations ( $\mu\text{M}$ ) of SuCh: 1, 0.3; 2, 0.5; 3, 0.8; 4, 1.3; 5, 2.5; 6, 5.0; 7, 7.6; 8, 13; 9, 25; 10, 50; 11, 100.

いて増加し、高濃度 ( $13\text{--}100\mu\text{M}$ ) で抑制された (Fig. 8, 9)。このとき  $\text{Ca}^{2+}$  transient を単収縮よりも 2.7 倍強く抑制した。 $\text{Ca}^{2+}$  transient および単収縮に対する SuCh の  $\text{IC}_{50}$  はそれぞれ  $10.3\mu\text{M}$  ( $8.6\text{--}12.4$ )、 $27.3\mu\text{M}$  ( $20.6\text{--}36.1$ ) であった。一方、pancuronium ( $0.1\text{--}1.1\mu\text{M}$ ) は抑制作用のみを示し、 $\text{Ca}^{2+}$  transient および単収縮を同程度に抑制した。 $\text{IC}_{50}$  はそれぞれ  $0.59\mu\text{M}$  ( $0.54\text{--}0.63$ )、 $0.67\mu\text{M}$  ( $0.63\text{--}0.71$ ) であった。この結果は以前 Kimura et al. (1990) が各濃度別に単独で投与して得られた結果と同じであり、投与方法のちがいによる

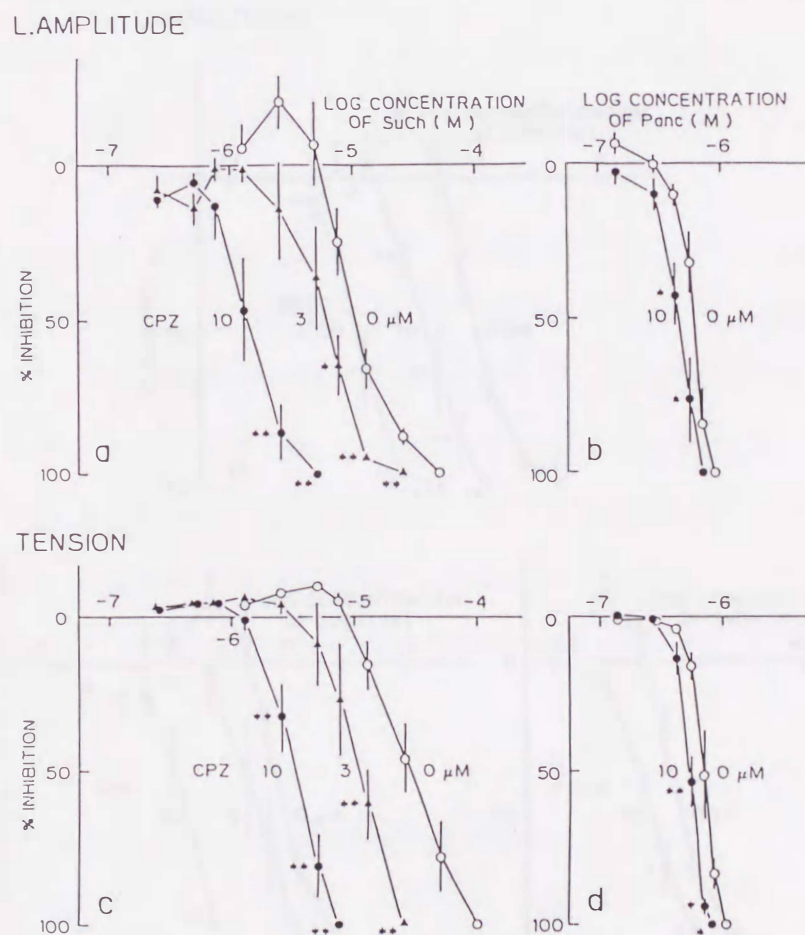


Fig. 9 The enhancing effect of chlorpromazine (CPZ) on succinylcholine- or pancuronium (Panc)-induced block of L.AMPLITUDE (contractile  $\text{Ca}^{2+}$  transients)(a and b) and on SuCh- or Panc-induced block of twitch tensions (c and d) in phrenic nerve-diaphragm muscles of mice. The preparations were pretreated with 3 (▲) and  $10\mu\text{M}$  (●) CPZ for 30 min and compared with the control response to SuCh alone (O). Each values are means  $\pm$  S.E., measured every 7 min after the increase in concentrations of SuCh or Panc ( $n = 5\text{--}6$ ). \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ ; significantly different from the response without CPZ by Student's unpaired t-test.



薬物効果の差は無かった。このように、収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient には収縮に関連しないバイパスルートと、直接収縮につながるルートが存在する。そして SuCh は前者を選択的に抑制すると考えられている。

これらの結果を基に、SuCh および pancuronium による神経筋遮断作用に対する n-ACh 受容体 channel blocker の効果を検討した。Chlorpromazine ( $3\text{--}10\mu\text{M}$ ) は高濃度の SuCh による収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient および単収縮の抑制作用を 2-9 倍増強した (Fig. 8, 9)。一方、pancuronium の作用においては chlorpromazine によ

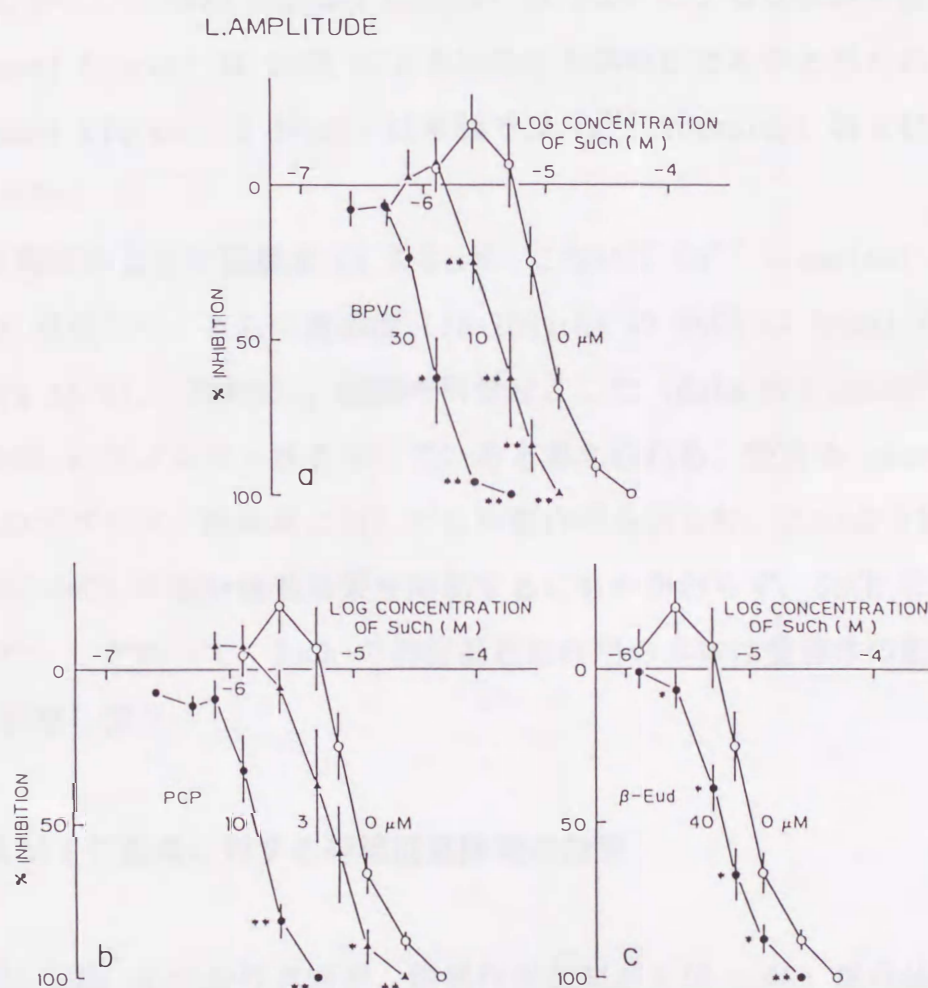


Fig. 10 The enhancing effect of bupivacaine (BPVC), phencyclidine (PCP) and  $\beta$ -eudesmol ( $\beta$ -Eud) on succinylcholine (SuCh)-induced block of L.AMPLITUDE (contractile  $\text{Ca}^{2+}$  transients) in mouse diaphragm muscles. The preparations were pretreated with BPVC and PCP for 30 min, and with  $\beta$ -Eud for 60 min, then compared with the control response to SuCh alone (O). Each values are means  $\pm$  S.E., measured every 7 min after the increase in concentrations of SuCh ( $n = 5\text{--}6$ ). \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ ; significantly different from the control response without any channel blockers by Student's unpaired t-test.

る増強効果は弱く、1.3 倍程度であった (Fig. 9)。同様に bupivacaine (10-30  $\mu\text{M}$ )、phencyclidine (3-10  $\mu\text{M}$ ) および  $\beta$ -eudesmol (40  $\mu\text{M}$ ) は SuCh による  $\text{Ca}^{2+}$  transient および単収縮の抑制作用を濃度依存的に 2-15 倍増強した (Fig. 10) が、pancuronium による抑制作用には影響しなかった (data not shown)。Channel blocker の効力を比較すると phencyclidine = chlorpromazine > bupivacaine >  $\beta$ -eudesmol (15:15:5:1) であった。このとき SuCh の作用に対する channel blocker の効果には、各々の作用機序の違いによる差異はみられなかった。しかし、closed channel blocker は SuCh による受容体の脱感作を促進し、open channel blocker は SuCh による活性化を抑制したものと思われる。なおこれらの channel blocker (3-40  $\mu\text{M}$ ) は単独では  $\text{Ca}^{2+}$  transient および単収縮には影響しなかった。

SuCh は前述のように低濃度 (1.3-5  $\mu\text{M}$ ) において  $\text{Ca}^{2+}$  transient および単収縮を 10-20% 増加した。さらに高濃度 (13-100  $\mu\text{M}$ ) の SuCh は basal の発光を増加し (Kimura et al., 1990b)、拘縮を引き起こした (data not shown)。これらの効果は SuCh のアゴニスト性を示していると考えられる。受容体-channel blocker は SuCh のアゴニスト性効果に対しても抑制作用を示した。このように channel blocker は SuCh の脱分極性効果を抑制するにもかかわらず、SuCh による抑制作用を増強した。したがって、SuCh の神経筋遮断作用の本体は受容体の脱感作促進効果であると結論し得た。

## 2. RAMIC 動員に対する神経筋遮断薬の効果

競合的拮抗薬、脱分極性遮断薬、脱感作促進剤および n-ACh 受容体-channel blocker で前処理した後、neostigmine (0.3  $\mu\text{M}$ ) を共存させ、RAMIC および収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  動員に生じる変化を検討した。その結果、RAMIC シグナルはその振幅や持続時間においてそれぞれ固有の特性を示すことが明らかになった。競合的拮抗薬 (+)-tubocurarine, pancuronium, および  $\alpha$ -bungarotoxin は低濃度 (0.03-0.05



$\mu\text{M}$ ) で RAMIC の持続時間を減少させた (Fig. 11, Table 1)。ここで用いた濃度を終板電流の抑制濃度 (Chang et al., 1989; Shaker et al., 1982) と比較すると、極めて低い濃度であることがわかる。このことは、RAMIC が終板電流とは別個の現象であることを示唆する。競合的拮抗薬による RAMIC の持続時間の減少効果をさら

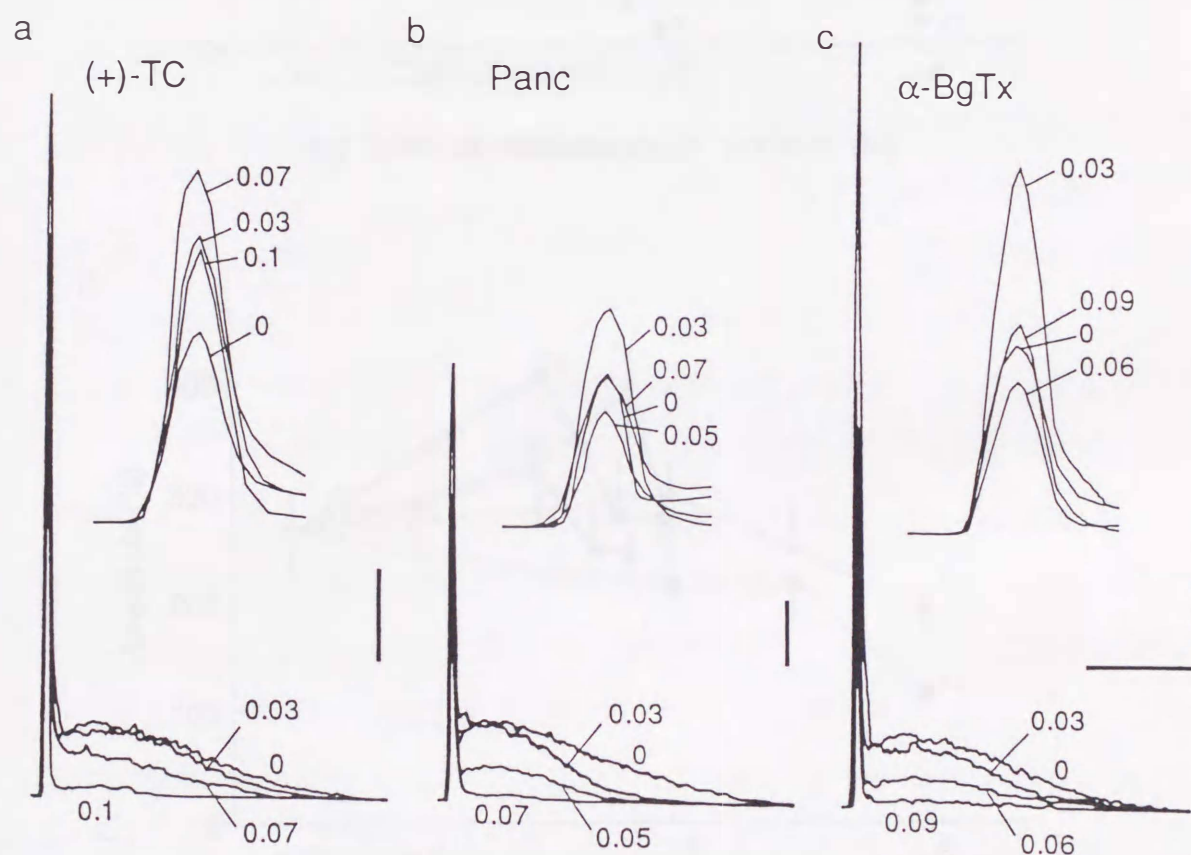


Fig. 11 Typical traces showing the inhibitory effects of competitive nicotinic antagonists on  $\text{Ca}^{2+}$  transients in diaphragm muscles treated with  $0.3 \mu\text{M}$  neostigmine. (+)-tubocurarine ((+)-TC, a) and pancuronium (Panc, b) were pretreated for 30 min, and  $\alpha$ -bungarotoxin ( $\alpha$ -BgTx, c) for 60 min at the concentrations indicated ( $\mu\text{M}$ ). Lower. Abscissa and ordinate calibration bars represent 0.3 s and 50% amplitude of contractile  $\text{Ca}^{2+}$  transients obtained before neostigmine exposure, respectively. Upper. The  $\text{Ca}^{2+}$  signals in the lower were expanded 10-fold along the time axis, to clearly demonstrate the changes in the contractile  $\text{Ca}^{2+}$  transients by competitive nicotinic antagonists. The same abscissa and ordinate calibration bars as those used for the lower signals indicate 30 ms and 100% amplitude, respectively.

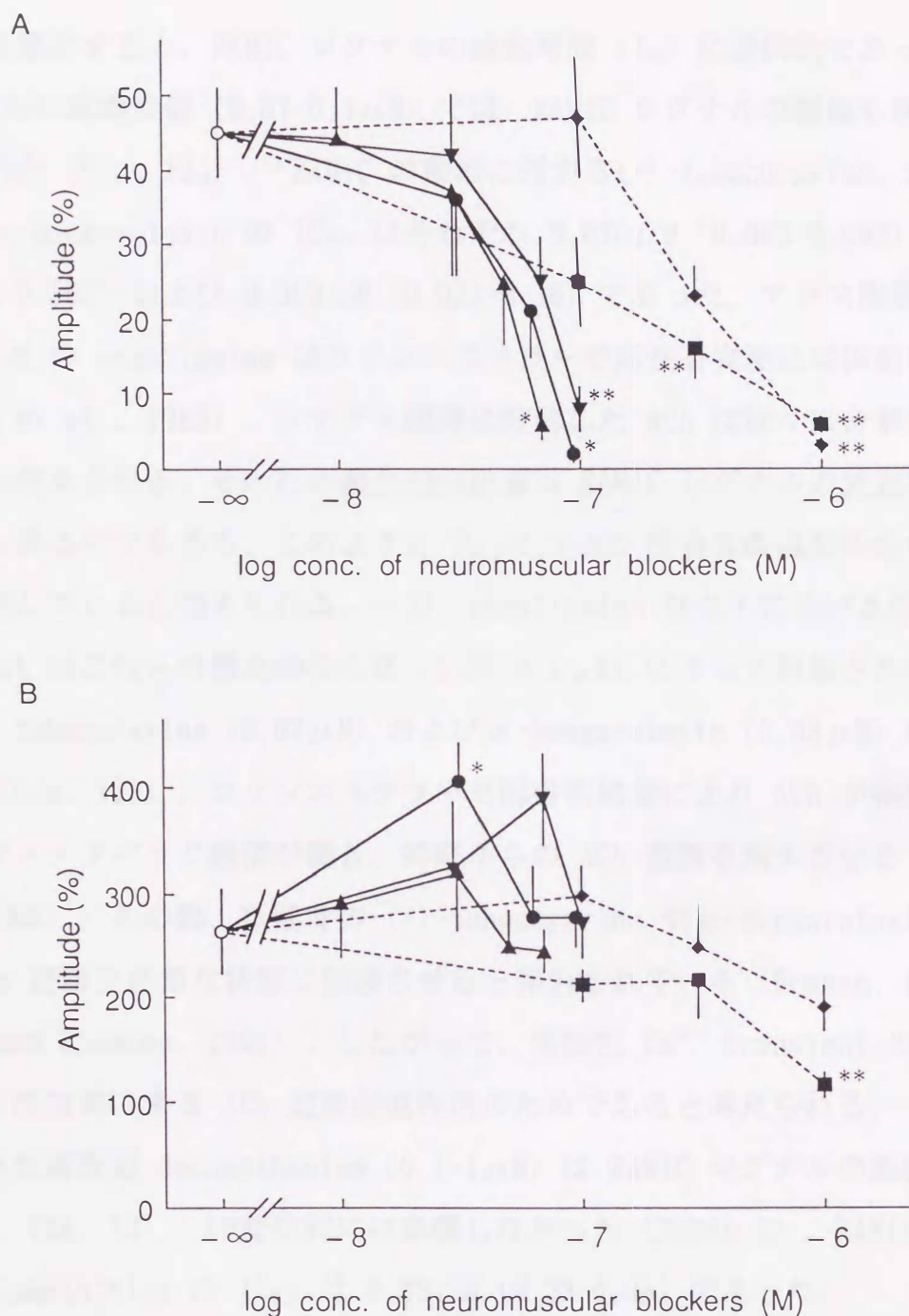


Fig. 12 Log concentration-response curves of (+)-tubocurarine (▼), pancuronium (▲),  $\alpha$ -bungarotoxin (●), suxamethonium (■) and decamethonium (◆) for (A) peak amplitude of noncontractile  $\text{Ca}^{2+}$  transients (RAMIC) and (B) peak amplitude of contractile  $\text{Ca}^{2+}$  transients observed in the presence of neostigmine ( $0.3\mu\text{M}$ ). Peak amplitude is expressed as a percentage of the control value of contractile  $\text{Ca}^{2+}$  transients obtained before the application of neostigmine. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ ; significantly different from the control response to neostigmine alone, by one-way ANOVA (Scheffe multiple-comparison test).



に詳しく解析すると、RAMIC シグナルの減衰時間 ( $T_2$ ) に選択的であった (Table 1)。さらに高濃度側 ( $0.07-0.1\mu\text{M}$ ) では、RAMIC シグナルの振幅も抑制することが示された (Fig. 12A)。RAMIC の振幅に対する (+)-tubocurarine, pancuronium, および  $\alpha$ -bungarotoxin の  $\text{IC}_{50}$  はそれぞれ  $0.075\mu\text{M}$  ( $0.062-0.091$ ),  $0.052\mu\text{M}$  ( $0.042-0.063$ ) および  $0.059\mu\text{M}$  ( $0.023-0.16$ ) であった。マウス横隔膜筋において  $0.3\mu\text{M}$  の neostigmine はコリンエステラーゼ活性を完全には抑制しないので (Chang et al., 1985)、シナプス間隙に貯留した ACh は徐々に分解されて減少してくると考えられる。そのため競合的拮抗薬は RAMIC シグナルの減衰時において特に奏効し得るのであろう。このように  $T_2$  は n-ACh 受容体後過程の活性化の持続時間を反映していると考えられる。一方、neostigmine 存在下における収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient はこれらの競合的拮抗薬 ( $0.01-0.1\mu\text{M}$ ) によって抑制されなかった。むしろ (+)-tubocurarine ( $0.07\mu\text{M}$ ) および  $\alpha$ -bungarotoxin ( $0.03\mu\text{M}$ ) によって増強された (Fig. 12B)。コリンエステラーゼ阻害剤処理により ACh が蓄積するとネガティブフィードバック機構が働き、神経からの ACh 遊離を減少させる (Chang et al., 1988)。その際、低濃度の (+)-tubocurarine や  $\alpha$ -bungarotoxin は、減少した ACh 遊離を正常な状態に回復させると報告されている (Bowman, 1990; Wilson and Thomsen, 1991)。したがって、収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient の増強効果はこれらの拮抗薬による ACh 遊離促進作用のためであると考えられる。

脱分極性遮断薬 decamethonium ( $0.1-1\mu\text{M}$ ) は RAMIC シグナルの振幅を抑制したが (Fig. 12A, 13)、持続時間には影響しなかった (Table 1)。RAMIC の振幅に対する decamethonium の  $\text{IC}_{50}$  は  $0.32\mu\text{M}$  ( $0.23-0.48$ ) であった。

Decamethonium の脱分極作用により外液  $\text{Ca}^{2+}$  流入に必要な電位差勾配が減少したため、RAMIC 動員が非特異的に抑制されたと考えられる。一方、脱感作促進剤としての SuCh ( $0.1-1\mu\text{M}$ ) は decamethonium とは異なり、RAMIC シグナルの振幅とピークまでの時間 ( $T_1$ ) の両方を抑制した (Fig. 13, Table 1)。RAMIC の振幅に対する SuCh の  $\text{IC}_{50}$  は  $0.13\mu\text{M}$  ( $0.04-0.41$ ) であった。また収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient は SuCh によって抑制された ( $\text{IC}_{50}=0.93\mu\text{M}$ ) が、decamethonium によ

って有意に変化しなかった (Fig. 12B)。SuCh は decamethonium と同程度の脱分極作用を示すが (Thesleff, 1955)、decamethonium よりも脱感作効果が強いという報告がある (Eldefrawi et al., 1982)。したがって SuCh は RAMIC 動員中に n-ACh 受容体を脱感作状態に移行させ、RAMIC 動員機構との機能的な連関 (カップリング) を弱めているといえる。そして、その結果 RAMIC シグナルは本来のピーク

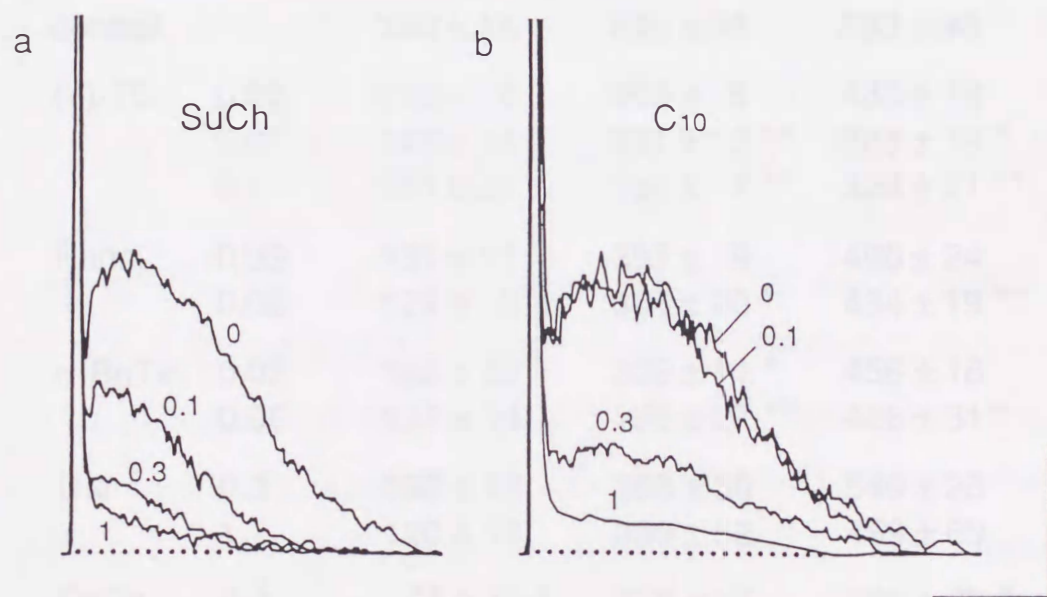


Fig. 13 Typical traces showing the inhibitory effects of depolarizing neuromuscular blockers on noncontractile  $\text{Ca}^{2+}$  transients (RAMIC) in diaphragm muscles treated with  $0.3 \mu\text{M}$  neostigmine. SuCh (a) and decamethonium (b) at the concentrations indicated ( $\mu\text{M}$ ) were pretreated for 30 min before the neostigmine exposure. To display clearly the decrease in rise time ( $T_1$ ) of RAMIC by SuCh, the vertically expanded records are used. The alteration of contractile  $\text{Ca}^{2+}$  transients are not shown (see Fig. 12C). Abscissa and ordinate calibration bars represent 0.3 s and 20% amplitude obtained before neostigmine exposure, respectively.



**Table 1**  
Influences of neuromuscular blockers on duration of noncontractile  $\text{Ca}^{2+}$  transients

Drug	conc. ( $\mu\text{M}$ )	$T_1$ (ms)	$T_2$ (ms)	total duration <sup>a</sup> (ms)	n
control		140 $\pm$ 15	423 $\pm$ 39	563 $\pm$ 48	8
(+)-TC	0.03	135 $\pm$ 7	303 $\pm$ 15	433 $\pm$ 19	5
	0.07	142 $\pm$ 14	251 $\pm$ 10 **	383 $\pm$ 19 *	6
	0.1	151 $\pm$ 21	193 $\pm$ 17 **	329 $\pm$ 21 **	5
Panc	0.03	131 $\pm$ 11	357 $\pm$ 19	490 $\pm$ 24	8
	0.05	122 $\pm$ 6	308 $\pm$ 20 *	434 $\pm$ 19 **	9
$\alpha$ -BgTx	0.03	162 $\pm$ 20	302 $\pm$ 11 *	456 $\pm$ 18	10
	0.06	137 $\pm$ 14	295 $\pm$ 27 **	426 $\pm$ 31 *	6
C <sub>10</sub>	0.3	160 $\pm$ 12	393 $\pm$ 30	549 $\pm$ 28	6
	1	120 $\pm$ 19	339 $\pm$ 52	459 $\pm$ 69	5
SuCh	0.3	77 $\pm$ 19 *	318 $\pm$ 57	388 $\pm$ 70 *	8
	1	76 $\pm$ 11 *	197 $\pm$ 47 **	276 $\pm$ 41 **	7

<sup>a</sup>Total duration consists of rise time ( $T_1$ ) and decay time ( $T_2$ ) in the presence of 0.3  $\mu\text{M}$  neostigmine.

\*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$ ; significantly different from the control response, determined by one-way ANOVA (Scheffé multiple-comparison test).

に達する以前に減衰を始めると考えられる。このように  $T_1$  は n-ACh 受容体と RAMIC 動員機構のカップリングの強度を反映している。

n-ACh 受容体-channel blocker は前述のようにその抑制作用機序により 3 タイプに分類されている (Albuquerque et al., 1988) : open channel blocker の bupivacaine はチャネル開口状態時に作用し、終板電流の持続時間を減少させる (Aracava et al., 1984) ; closed channel blocker の chlorpromazine はチャネル閉口状態時に作用し、終板電流の振幅を抑制する (Carp et al., 1983) ; open and closed channel blocker の phencyclidine および  $\beta$ -eudesmol はチャネル開閉両状態時に作用して、終板電流の振幅と持続時間の両方を減少させる (Aguayo et al., 1986; Kimura et al., 1991a) 。各種の受容体-channel blocker ( $1-40\mu\text{M}$ ) は収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient を同程度に抑制し、作用機序の違いによる差異はみられなかったが (Fig. 15B) 、RAMIC シグナルに対しては異なるパターンで抑制した (Fig. 14) 。Bupivacaine ( $3\mu\text{M}$ ) は RAMIC の振幅を 40% 抑制したが (Fig. 15A) 、持続時間には影響しなかった (Table 2) 。Chlorpromazine ( $3\mu\text{M}$ ) は持続時間を 40% 減少させたが (Table 2) 、振幅には影響しなかった (Fig. 15A) 。また phencyclidine ( $1\mu\text{M}$ ) は振幅と持続時間をそれぞれ 30%, 20% 抑制した (Fig. 15A, Table 2) 。このように、異なる 3 種の channel blocker の作用は、RAMIC の振幅および持続時間においても三つのパターンを示すことが明らかになった。しかしながら、これらの channel blocker は終板電流の抑制様式とは異なるパターンで RAMIC を抑制したことから、RAMIC は受容体チャネルを介する終板電流とは独立した機構で動員されることが確かめられた。 $\beta$ -Eudesmol ( $0.5-40\mu\text{M}$ ) は、RAMIC の持続時間を減少させたが、振幅には影響しなかった。このことから RAMIC に対する  $\beta$ -eudesmol の効果は chlorpromazine の効果に類似していることが示された。

さらに RAMIC シグナルの持続時間の変化を  $T_1$  と  $T_2$  に分けて解析すると、chlorpromazine ( $>3\mu\text{M}$ ) , phencyclidine ( $>3\mu\text{M}$ ) ,  $\beta$ -eudesmol ( $>2\mu\text{M}$ ) は  $T_1$  と  $T_2$  の両方を有意に抑制した (Table 2) 。このとき bupivacaine も高濃度



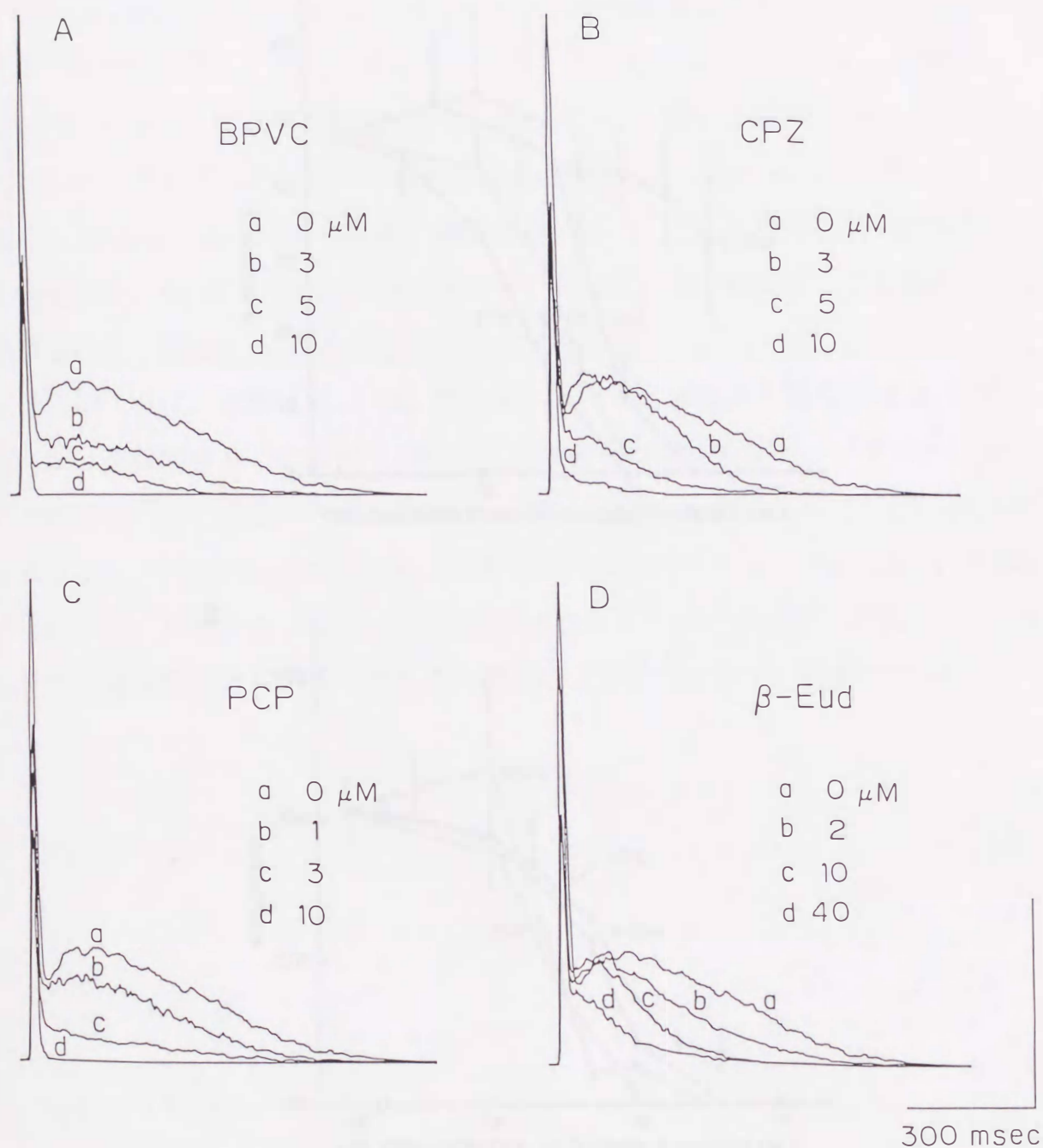


Fig. 14 Typical fast traces of inhibitory effects of n-ACh receptor-channel blockers on  $\text{Ca}^{2+}$  transients in mouse diaphragm muscles treated with  $0.3 \mu\text{M}$  neostigmine. Bupivacaine (BPVC), chlorpromazine (CPZ) and phencyclidine (PCP) were pretreated for 30 min and  $\beta$ -eudesmol ( $\beta$ -Eud) for 60 min before the application of neostigmine. An ordinate calibration bar represents 100 % amplitude of contractile  $\text{Ca}^{2+}$  transients before the application of neostigmine. The same record is shown for control values obtained without channel blockers. Data obtained from separate preparations were normalized and superimposed.

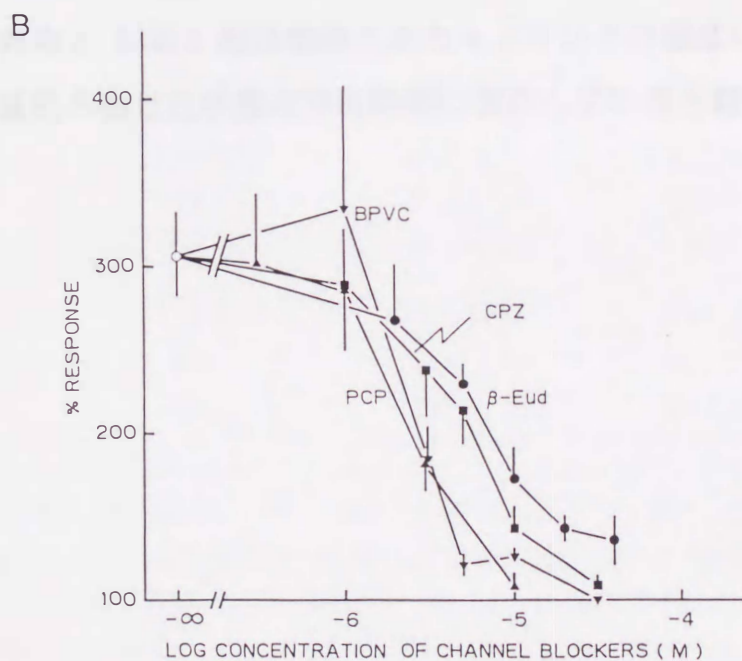
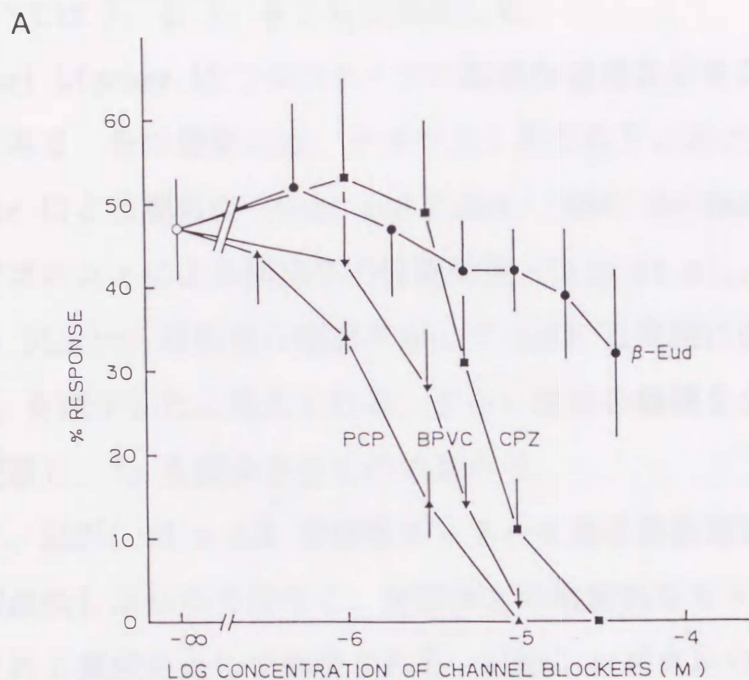


Fig. 15 Log concentration-response curves of bupivacaine (BPVC; ▼), chlorpromazine (CPZ; ■), phencyclidine (PCP; ▲) and  $\beta$ -eudesmol ( $\beta$ -Eud; ●) for (A) peak amplitude of noncontractile  $\text{Ca}^{2+}$  transient (RAMIC) and for (B) total amount of contractile  $\text{Ca}^{2+}$  transients observed in the presence of neostigmine ( $0.3\mu\text{M}$ ).  $n = 7$  to 12. Both peak amplitude and total amount are expressed as a percentage of the control value of contractile  $\text{Ca}^{2+}$  transients obtained before the application of neostigmine.



( $>5\mu\text{M}$ ) においては  $T_1$  と  $T_2$  をともに抑制した。

Closed channel blocker は二つのタイプの脱感作促進効果を介して n-ACh 受容体を不活性化し得る。その効果とは、アゴニスト非存在下における closed channel blocker による脱感作 (Boyd and Cohen, 1984; Heidman and Changeux, 1979) およびアゴニストによる脱感作の促進効果 (Carp et al., 1983) である。おそらく channel blocker は前者の機構を介して SuCh と同様に直接受容体を脱感作させた結果、 $T_1$  を減少したと考えられる。さらに後者の機構を介して受容体後過程の不活性化を促進し、 $T_2$  を減少させたのであろう。

以上のように、RAMIC は n-ACh 受容体チャネルを通る終板電流の成分 ( $\text{Ca}^{2+}$  influx) を直接反映したものではなく、受容体との機能的なカップリングが生じたときに活性化される機構を介して動員される。RAMIC シグナルの  $T_1$ ,  $T_2$  はこのカップリングの状態によってそれぞれ独立に制御されている (Fig. 16)。すなわち  $T_1$  は n-ACh 受容体と RAMIC 動員機構とのカップリングの強度に依存し、 $T_2$  は n-ACh 受容体後過程の活性化状態の持続時間に依存していると結論できる。

**Table 2**

Effects of competitive, depolarizing and n-ACh receptor-channel blockers on time course of noncontractile  $\text{Ca}^{2+}$  transients in diaphragm muscles of mice.

Drug	conc. ( $\mu\text{M}$ )	Duration (msec)			n
		T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	total	
control		148 $\pm$ 11	341 $\pm$ 16	490 $\pm$ 18	11
BPVC	3	141 $\pm$ 6	297 $\pm$ 31	438 $\pm$ 34	8
	5	70 $\pm$ 10 **	186 $\pm$ 33 **	256 $\pm$ 41 **	7
	10	38 $\pm$ 8 **	22 $\pm$ 22 **	60 $\pm$ 30 **	6
CPZ	1	120 $\pm$ 16	287 $\pm$ 19	407 $\pm$ 26 **	7
	3	99 $\pm$ 3 *	203 $\pm$ 12 **	302 $\pm$ 12 **	7
	5	75 $\pm$ 7 **	176 $\pm$ 10 **	251 $\pm$ 15 **	7
PCP	0.3	128 $\pm$ 10	321 $\pm$ 11	450 $\pm$ 12	8
	1	107 $\pm$ 7	302 $\pm$ 14	409 $\pm$ 15	8
	3	58 $\pm$ 14 **	201 $\pm$ 57 *	258 $\pm$ 67 **	8
$\beta$ -Eud	0.5	114 $\pm$ 5	250 $\pm$ 11 *	364 $\pm$ 10 **	9
	2	94 $\pm$ 6 **	196 $\pm$ 27 **	291 $\pm$ 25 **	8
	5	88 $\pm$ 12 **	205 $\pm$ 15 **	293 $\pm$ 22 **	8

Total duration consists of time to peak (T<sub>1</sub>) and decay time (T<sub>2</sub>). Bupivacaine (BPVC), chlorpromazine (CPZ) and phencyclidine (PCP) were preincubated for 30 min and  $\beta$ -eudesmol ( $\beta$ -Eud) for 60 min before application of 0.3  $\mu\text{M}$  neostigmine. Values are the mean  $\pm$  S.E. Levels of significance determined by one-way ANOVA (Scheffé): \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  (compared with control values).



## 【要約】

- (1) n-ACh 受容体による RAMIC 動員の制御を明らかにするため、neostigmine (0.3  $\mu$ M) 存在下において種々の神経筋遮断薬の効果を比較検討した。
- (2) n-ACh 受容体競合的拮抗薬の (+)-tubocurarine, pancuronium,  $\alpha$ -bungarotoxin は極めて低い濃度 (0.03-0.1  $\mu$ M) で RAMIC 動員のみを抑制した。その結果 RAMIC シグナルの減衰速度が速まり、減衰時間 ( $T_2$ ) が短縮した。
- (3) SuCh (13-100  $\mu$ M) による収縮性  $Ca^{2+}$  transient 抑制作用は、受容体-channel blocker (3-40  $\mu$ M) によって増強されたが、pancuronium (0.1-1.1  $\mu$ M) の作用は全く影響されなかった。この脱感作促進剤としての SuCh (0.1-1  $\mu$ M) は RAMIC の振幅およびピークまでの時間 ( $T_1$ ) を抑制した。これは、SuCh が RAMIC シグナルの減衰開始時点を早めた結果であると考えられる。
- (4) Closed channel blocker の chlorpromazine (3  $\mu$ M) は RAMIC の振幅には影響せず、持続時間を減少させた。このとき、 $T_1$  と  $T_2$  の両方が減少した。Open and closed channel blocker の phencyclidine (3  $\mu$ M) は RAMIC の振幅および持続時間 ( $T_1$  および  $T_2$ ) を同程度に抑制した。 $\beta$ -Eudesmol (2-40  $\mu$ M) は RAMIC の持続時間 ( $T_1$  および  $T_2$ ) のみを抑制し、振幅には全く影響しなかった。このため、chlorpromazine の効果に類似していることが示された。
- (5) 脱分極性遮断薬 decamethonium (1  $\mu$ M) および open channel blocker の bupivacaine (3  $\mu$ M) は RAMIC の振幅を抑制したが、持続時間には影響しなかった。
- (6) 以上のように、神経筋遮断薬が直接 n-ACh 受容体の脱感作を引き起こすと  $T_1$  が減少し、n-ACh 受容体後過程の不活性化を促進すると  $T_2$  が減少した (Fig. 16)。このことから RAMIC シグナルの  $T_1$  は n-ACh 受容体と RAMIC 動員機構とのカップリングの強度を反映し、 $T_2$  は n-ACh 受容体後過程の活性化状態の持続時間を反映していることが示された。

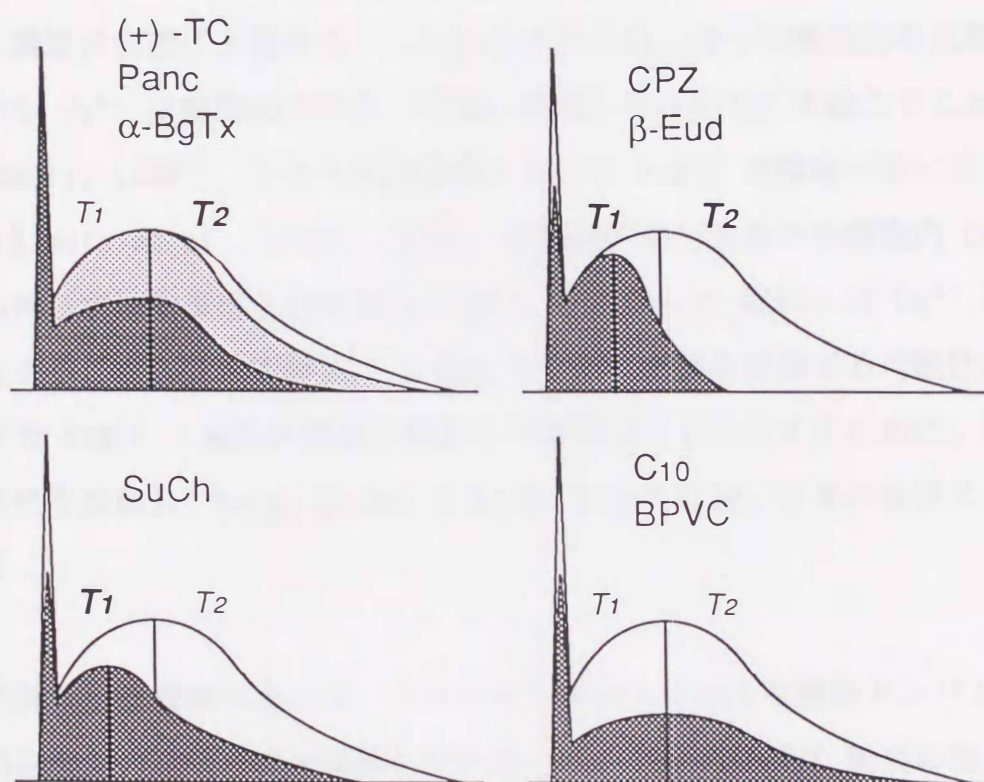


Fig. 16 Different mode of inhibition of noncontractile  $\text{Ca}^{2+}$  transients (RAMIC) by several types of neuromuscular blockers.  $T_1$  represents time to peak, and  $T_2$  represents the decay time from peak to  $1/e$  amplitude of RAMIC signal. (+)-Tubocurarine, pancuronium and  $\alpha$ -bungarotoxin selectively shortened  $T_2$  of RAMIC. In contrast, SuCh decreased  $T_1$  and peak amplitude of RAMIC. Chlorpromazine and  $\beta$ -eudesmol shortened both  $T_1$  and  $T_2$ . Decamethonium and bupivacaine suppressed the peak amplitude of RAMIC without affecting the duration.



### Ⅲ-3 RAMICシグナルと細胞内情報伝達系との連関

生体細胞では一般に細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は細胞外液の  $10^{-4}$  倍 ( $0.1\mu\text{M}$ ) 程度に低く保たれている。したがって外部からの情報に応じて  $\text{Ca}^{2+}$  が動員されると、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は急激に上昇する。この変化が引き金となって細胞応答反応を惹起する。しかも  $\text{Ca}^{2+}$  は細胞内で特定の局所に限局した反応を引き起こすことが可能である (Ohmori, 1988)。マウス横隔膜筋において RAMIC は終板付近に限局して動員される (Kimura et al., 1989)。RAMIC は持続的かつ大量の筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動員であるにも拘らず収縮反応を引き起こさない。したがって RAMIC は  $\text{Ca}^{2+}$  依存性酵素を活性化することによって終板の n-ACh 受容体の機能を修飾する可能性が考えられる。そこで RAMIC と細胞内情報伝達系との連関を明らかにするために、種々の細胞内酵素活性を修飾し、neostigmine ( $0.3\mu\text{M}$ ) 存在下においてその作用スペクトルを検討した。

細胞内情報伝達機構において、プロテインキナーゼによる機能タンパク質のリン酸化は細胞機能の発現を直接制御している。そこでまず RAMIC 動員の駆動機構におけるプロテインキナーゼ A (PKA) の関与を検討した。PKA 阻害剤の H-89 ( $0.3\mu\text{M}$ ) (Chijiwa et al., 1990) は RAMIC の振幅を抑制した。H-89 の効果のネガティブコントロールとして対照薬の H-85 ( $0.3\mu\text{M}$ ) を投与しても RAMIC には影響がなかった (Fig. 17)。したがって H-89 による RAMIC の抑制は PKA を特異的に阻害した結果であることが確かめられた。他方、収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient は H-89 および H-85 によって抑制されなかった。このように RAMIC 動員機構には PKA の活性化が介在していることが明らかになった。骨格筋において、PKA の活性化を介する  $\text{Ca}^{2+}$  動員機構の存在が実証されたのは初めてのことである。

プロテインキナーゼ C (PKC) 阻害剤の staurosporine ( $10\text{ nM}$ ) および H-7 ( $10\mu\text{M}$ ) (Ruegg and Burgess, 1989) は収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient, RAMIC のいずれにも影響しなかった。したがって、PKC は RAMIC 動員の駆動過程には関与してい

ないことが示された。PKC活性化剤である 12-0-tetradecanoyl phorbol 13-acetate (TPA, 0.3-1 $\mu$ M) (Nishizuka, 1984) は収縮性  $Ca^{2+}$  transient のみを 0.5-0.6 倍に抑制したが RAMIC には影響しなかった。TPA の効果のネガティブコン

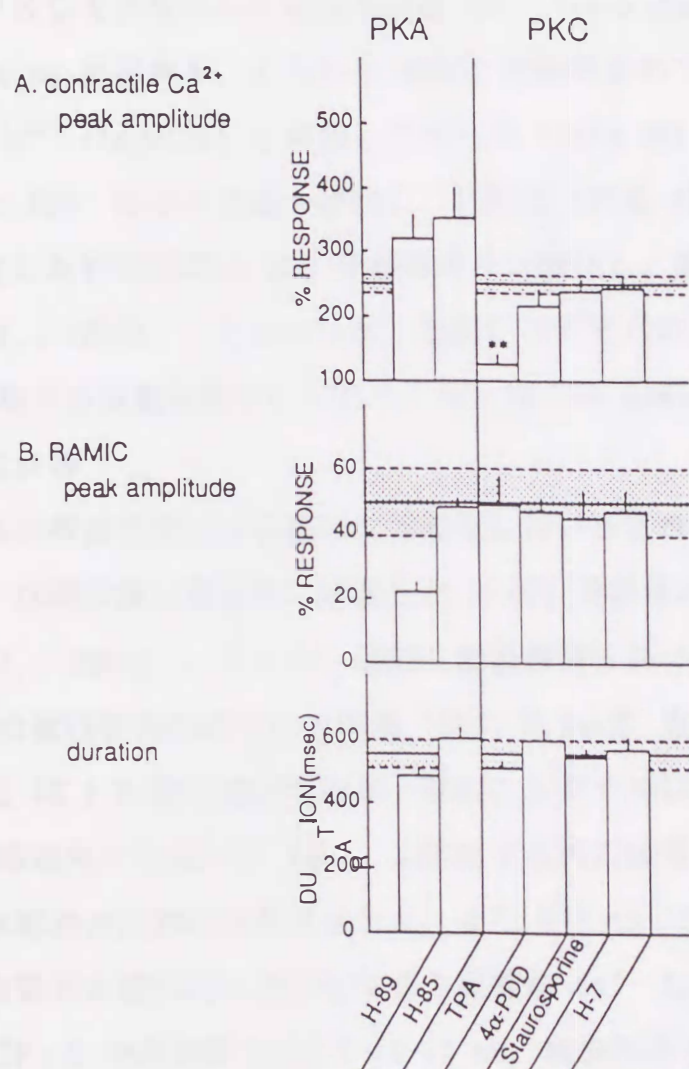


Fig. 17 Pharmacological spectra of protein kinase A- and protein kinase C-related agents on contractile  $Ca^{2+}$  mobilization (A, upper) and RAMIC mobilization (B, peak amplitude: middle; duration: lower) in mouse diaphragm muscle treated with neostigmine (0.3 $\mu$ M). H-89 (0.3 $\mu$ M), H-85 (0.3 $\mu$ M), TPA (1 $\mu$ M), 4 $\alpha$ -PDD (1 $\mu$ M), staurosporine (10 nM) and H-7 (10 $\mu$ M) were pretreated for 30 min before the application of neostigmine. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ ; significantly different from the control response to neostigmine alone, by one-way ANOVA (Scheffe multiple-comparison test).



トロールとして対照薬の  $4\alpha$ -phorbol 12,13-didecanoate ( $4\alpha$ -PDD,  $1\mu\text{M}$ ) を投与しても、両タイプの  $\text{Ca}^{2+}$  transient は変化しなかった。TPA は神経からの ACh 遊離を促進する (Murphy and Smith, 1987) ので、TPA による収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient の抑制は ACh 遊離の減少のためではない。したがって、TPA は神経筋シナプス後膜の PKC を活性化した結果収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient を抑制したと考えられる。Neostigmine 非存在下、すなわち RAMIC が動員されていない状態においては、TPA は収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient を抑制しなかった (data not shown)。PKC は細胞内で上昇した  $\text{Ca}^{2+}$  によって膜へ移行し、活性化される (Bazzi and Nelsestuen, 1988)。活性化した PKC は n-ACh 受容体をリン酸化し、脱感作を促進する (Eusebi et al., 1987b)。したがって、RAMIC は PKC の活性化を介して収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  動員を抑制する役割を果たしており、TPA はこの RAMIC による抑制過程を促進したと考えられる。

n-ACh 受容体の機能発現には G 蛋白質は介在しないとされているが、培養骨格筋細胞において、G 蛋白質と機能的に関連した n-ACh 受容体の存在が示唆されている (Eusebi et al., 1987a)。そこで、RAMIC 動員機構における G 蛋白質の関与を検討した。Gs 蛋白質活性化剤のコレラ毒素 (CTX,  $0.1\mu\text{M}$ ) を投与すると収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient は 1.6 倍に増加したが、RAMIC シグナルは変化しなかった (Fig. 18)。抑制性の G 蛋白質 ( $\text{Gi}$ ) を阻害する百日咳毒素 (PTX,  $50\mu\text{g/kg}$ , i.v.) もコレラ毒素と同様の効果を示した。また  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  ( $1-10\text{ mM}$ , 細胞内注入) によって G 蛋白質を非選択的に活性化すると収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient のみが増加したのに対し、 $\text{GTP}\gamma\text{S}$  の対照薬  $\text{GDP}\beta\text{S}$  ( $1-10\text{ mM}$ , 細胞内注入) 処理ではいずれの  $\text{Ca}^{2+}$  transient も変化しなかった。これらのことから、G 蛋白質は収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient の増強機構には関与しているが、RAMIC 動員の駆動過程には関与しないことが示された。

ホスホリパーゼ  $\text{A}_2$  は細胞膜リン脂質に作用し、アラキドン酸、プロスタグランジン類、ロイコトリエン類などのメディエーター産生を律速する酵素である。ホスホリパーゼ  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ,  $10,000\text{ U/ml}$ ) を細胞内に注入すると収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient

は 1.3 倍に増加したが、RAMIC シグナルは影響されなかった。シクロオキシゲナーゼ阻害剤の indomethacin ( $10\mu\text{M}$ ) は収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient および RAMIC シグナルのいずれにも作用しなかった。このようにホスホリパーゼ  $\text{A}_2$  系は RAMIC 動員の

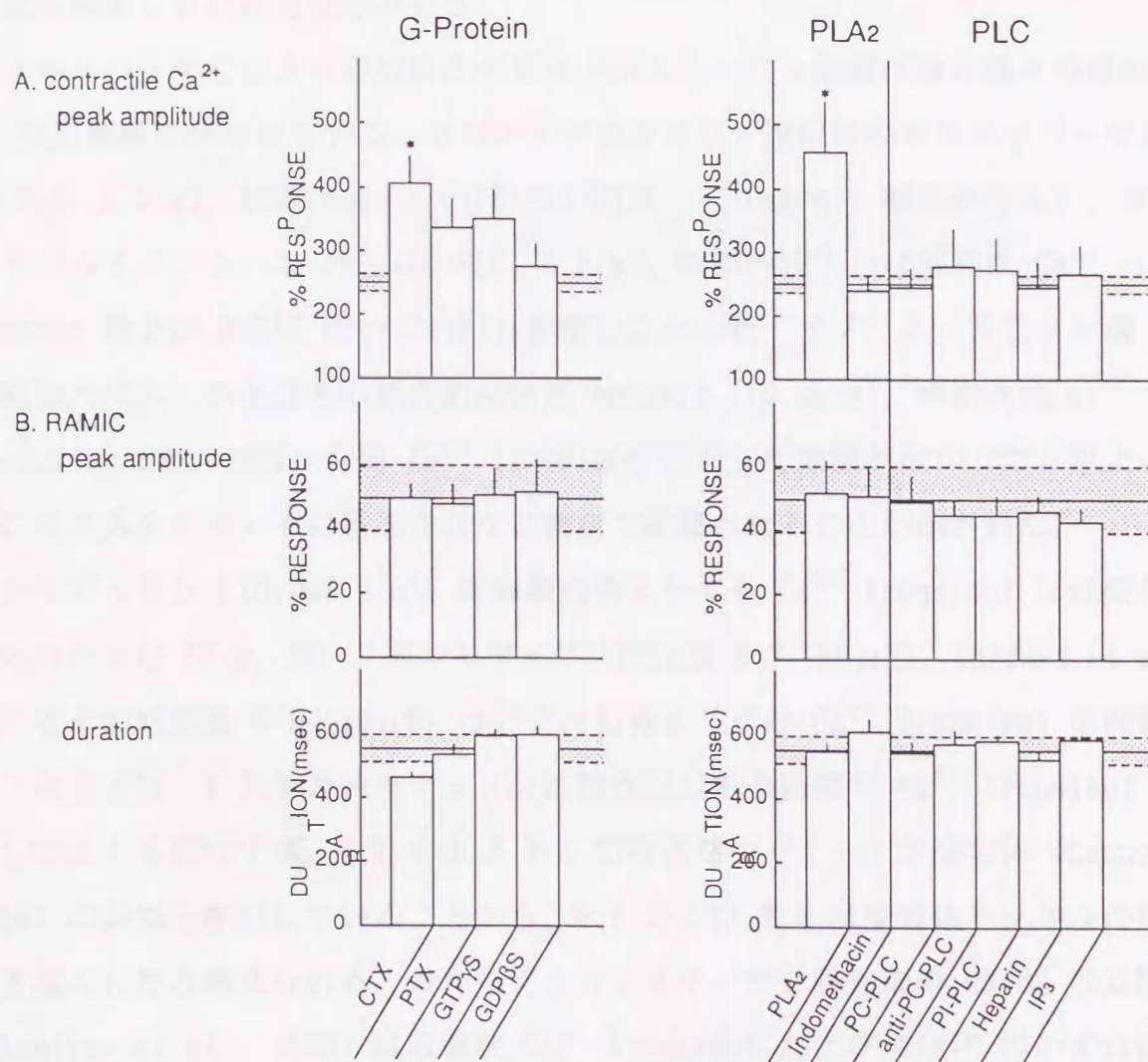


Fig. 18 Pharmacological spectra of G-protein-, phospholipase C- and phospholipase  $\text{A}_2$ -related agents on contractile  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization (A, upper) and RAMIC mobilization (B, peak amplitude: middle; duration: lower) in mouse diaphragm muscle treated with neostigmine ( $0.3\mu\text{M}$ ). Pertussis toxin (PTX) was injected into tail vein ( $50\mu\text{g}/\text{ml}$ , 3-5 days elapsed). GTP $\gamma$ S ( $10\text{ mM}$ ), GDP $\beta$ S ( $10\text{ mM}$ ), phospholipase  $\text{A}_2$  (PLA<sub>2</sub>,  $10,000\text{ U}/\text{ml}$ ), PC-PLC ( $5\text{ U}/\text{ml}$ ), anti-PC-PLC ( $10\text{ mg}/\text{ml}$ ), PI-PLC ( $5\text{ U}/\text{ml}$ ), heparin ( $10\text{ mg}/\text{ml}$ ) and inositol 1,4,5 triphosphate (IP<sub>3</sub>,  $5\text{ mM}$ ) were injected into muscle fibers. Cholera toxin (CTX,  $0.1\mu\text{M}$ ) was pretreated for 3 h and indomethacin for 30 min before application of neostigmine. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ ; significantly different from the control response to neostigmine alone, by one-way ANOVA (Scheffe multiple-comparison test).



駆動過程には関与していない。ホスホリパーゼA<sub>2</sub>は細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇によって膜へ移行し、活性化することが知られている (Yoshihara and Watanabe, 1990)。またアラキドン酸は筋小胞体からのCa<sup>2+</sup>遊離を促進する (Cheah, 1981)。したがってRAMICはシナプス後膜に存在するホスホリパーゼA<sub>2</sub>を介して収縮性Ca<sup>2+</sup>動員機構を調節している可能性がある。

ホスホリパーゼCによって活性化するイノシトールリン脂質代謝は種々の細胞内Ca<sup>2+</sup>動員機構に関与している。ホスファチジルコリン選択性のホスホリパーゼC (PC-PLC, 5 U/ml, 細胞内注入), PC-PLC抗体 (1-10mg/ml, 細胞内注入)、ホスファチジイルイノシトール-PLC (PI-PLC, 5 U/ml, 細胞内注入) は収縮性Ca<sup>2+</sup> transient およびRAMICのいずれにも影響しなかった。イノシトール三リン酸 (5 mM, 細胞内注入) およびその競合的拮抗薬 heparin (10 mg/ml, 細胞内注入) (Worley et al., 1987) も両Ca<sup>2+</sup> transient に対して効果がなかった。以上より、RAMICはホスホリパーゼC系を介さない機構で動員されることが示された。

カルモデュリン (10,000 U/ml) を細胞内注入してもCa<sup>2+</sup> transient には変化がみられなかった (Fig. 19)。カルモデュリン拮抗薬 W-7 (10 μM) (Hidaka et al., 1980) とその対照薬 W-5 (10 μM) はいずれも両タイプのCa<sup>2+</sup> transient を抑制した。このことは、W-7がカルモデュリン拮抗作用以外の効果でCa<sup>2+</sup> transient に作用したことを意味する。W-7 および W-5 の抑制作用パターンが受容体-channel blocker の効果と酷似していることから、W-7 および W-5 は受容体チャネルの抑制を引き起こしたと考えられる。カルモデュリンキナーゼII阻害剤のKN-62 (5 μM) (Tokumitsu et al., 1990) は収縮性Ca<sup>2+</sup> transient およびRAMICのいずれにも作用しなかった。したがってRAMICの動員機構にはカルモデュリン系は関与しないといえる。

その他、インスリン (10 ng/ml)、カルパイン阻害剤のE-64 (10 mM, 細胞内注入) およびleupeptin (10 mM, 細胞内注入) は収縮性Ca<sup>2+</sup> transient, RAMICのいずれにも作用しなかった。またNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 阻害剤のouabain (3 μM) は収縮性Ca<sup>2+</sup> transient を抑制したがRAMICには影響しなかったので、細胞内Na<sup>+</sup>

の貯留に伴う  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  交換は RAMIC 動員機構に関与しないと考えられる。

以上の結果から、RAMIC の動員には PKA の活性化が不可欠であることを見いだした。また RAMIC は PKC、あるいはホスホリパーゼ  $\text{A}_2$  を活性化することにより、収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  動員を修飾している可能性を示すことができた。

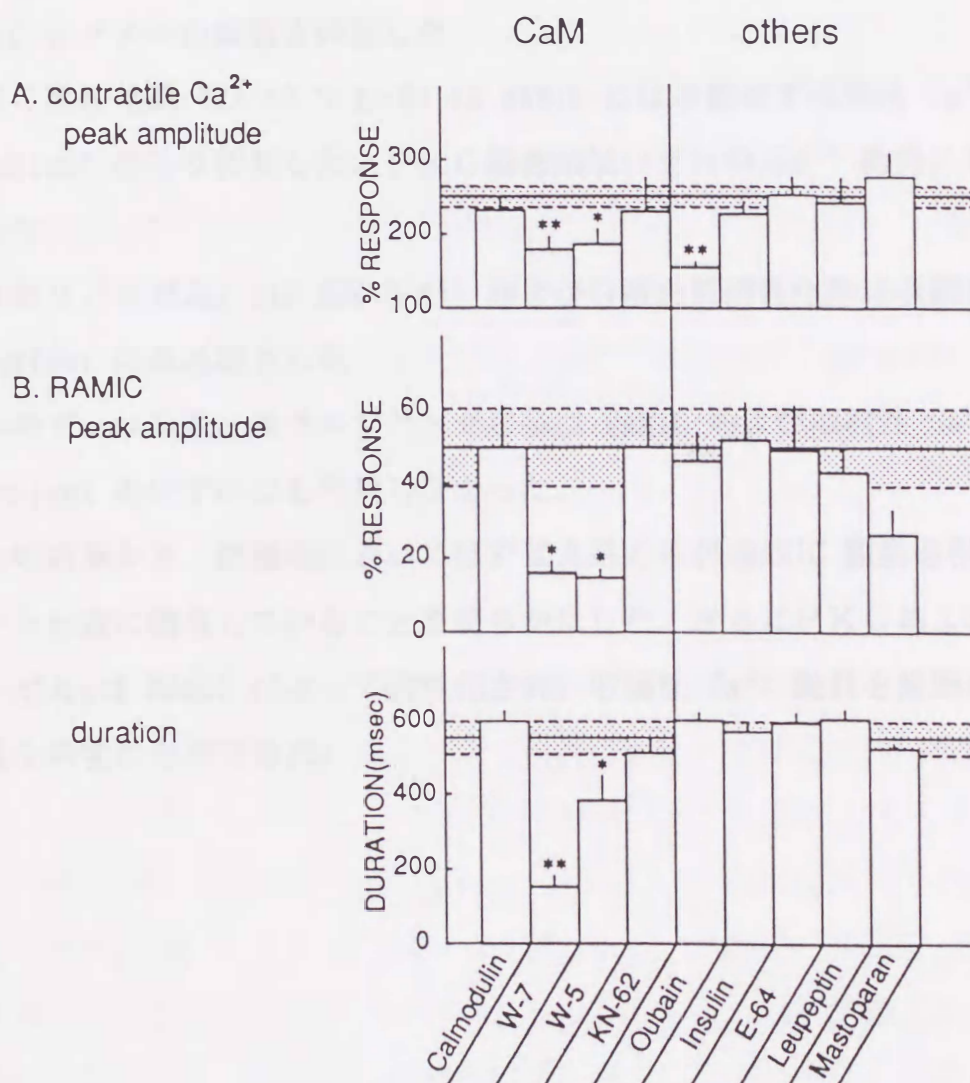


Fig. 19 Pharmacological spectra of calmodulin-related agents and others on contractile  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization (A, upper) and RAMIC mobilization (B, peak amplitude: middle; duration: lower) in mouse diaphragm muscle treated with neostigmine ( $0.3\mu\text{M}$ ). Calmodulin ( $10,000\text{ U/ml}$ ), E-64 ( $10\text{ mM}$ ) and leupeptin ( $10\text{ mM}$ ) were injected into muscle fibers. W-7 ( $10\mu\text{M}$ ), W-5 ( $10\mu\text{M}$ ), KN-62 ( $5\mu\text{M}$ ), ouabain ( $3\mu\text{M}$ ) and mastoparan ( $1\mu\text{M}$ ) were pretreated for 30 min and insulin ( $10\text{ ng/ml}$ ) for 60 min before the application of neostigmine. \* $P<0.05$  and \*\* $P<0.01$ ; significantly different from the control response to neostigmine alone, by one-way ANOVA (Scheffe multiple-comparison test).



## 【要約】

- (1) RAMIC 動員に関連のある細胞内情報伝達系を明らかにするため、細胞内酵素活性を修飾し、その作用スペクトルを検討した。
- (2) Neostigmine ( $0.3\mu\text{M}$ ) 存在下において、PKA阻害剤 H-89 ( $0.3\mu\text{M}$ ) は RAMIC シグナルの振幅を抑制した。
- (3) PKC活性化剤 TPA ( $0.3\text{--}1\mu\text{M}$ ) は RAMIC には影響せず収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient のみを抑制した。PKC阻害剤はいずれの  $\text{Ca}^{2+}$  動員にも影響しなかった。
- (4) ホスホリパーゼ  $\text{A}_2$  ( $10,000\text{ U/ml}$ ) およびG蛋白質活性化剤は収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient のみを増大した。
- (5) カルモデュリン系、ホスホリパーゼC系は RAMIC および収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient のいずれにも作用しなかった。
- (6) 以上の結果から、細胞内においてはPKA系のみが RAMIC 駆動過程におけるシグナル伝達に関与していることを明らかにした。さらにPKCおよびホスホリパーゼ  $\text{A}_2$  は RAMIC によって活性化され、収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  動員を修飾している可能性を示すことができた。

## 第Ⅳ章 RAMICシグナルの動員機構

前章のⅢ-3で RAMIC の駆動過程にPKAの活性化が関与していることが示された。筋細胞内のPKAの活性化因子として神経伝達物質の CGRP が知られている (Miles et al., 1989)。CGRP は運動神経終末において ACh と共存し (Takami et al., 1985)、神経が持続的に刺激されることにより遊離される (Sakaguchi et al., 1991; Csillik et al., 1993)。シナプス後膜には CGRP 受容体が存在し、しかも終板に局在している (Poyner et al., 1992; Popper and Micevych, 1989)。CGRP がその受容体に結合するとアデニル酸シクラーゼが活性化し、cAMP が増加する。その結果、筋細胞内のPKAを活性化するとされている (Matsumoto et al., 1992)。しかし、神経筋シナプスにおける CGRP の役割は未だ確立されていない。そこで本章では、RAMIC 動員のシグナル駆動機構における CGRP の関与を検討した。

### Ⅳ-1 神経筋シナプス後膜におけるRAMICの駆動機構

Neostigmine ( $0.3\mu\text{M}$ ) 存在下において CGRP ( $0.3\text{-}10\text{ nM}$ ) を投与すると、RAMIC シグナルの持続時間は 10-30% 延長した (Fig. 20b)。また CGRP 拮抗薬の  $\text{CGRP}_{8-37}$  ( $10\text{-}20\mu\text{M}$ ) は RAMIC シグナルの持続時間を 10-30% 減少した (Fig. 20a)。いずれの場合も収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient および RAMIC シグナルの振幅には変化がみられなかった。さらに  $\text{CGRP}_{8-37}$  ( $0.1\mu\text{M}$ ) は CGRP ( $10\text{ nM}$ ) による RAMIC 動員の増強効果を消失させた。これらのことから、RAMIC 動員の駆動過程には内因性の CGRP による CGRP 受容体の活性化が介在していることを明らかにした。一方、neostigmine 非存在下において CGRP を投与しても RAMIC は動員されなかった。したがって、内因性の CGRP は神経筋シナプス間隙に ACh が蓄積した際に RAMIC 動員を惹起するといえる。

さらに RAMIC 動員機構における CGRP とPKAとの連関を検証した。PKA阻害剤 H-89 ( $0.1\text{-}1\mu\text{M}$ ) は濃度依存的に RAMIC シグナルの振幅と持続時間を減少した



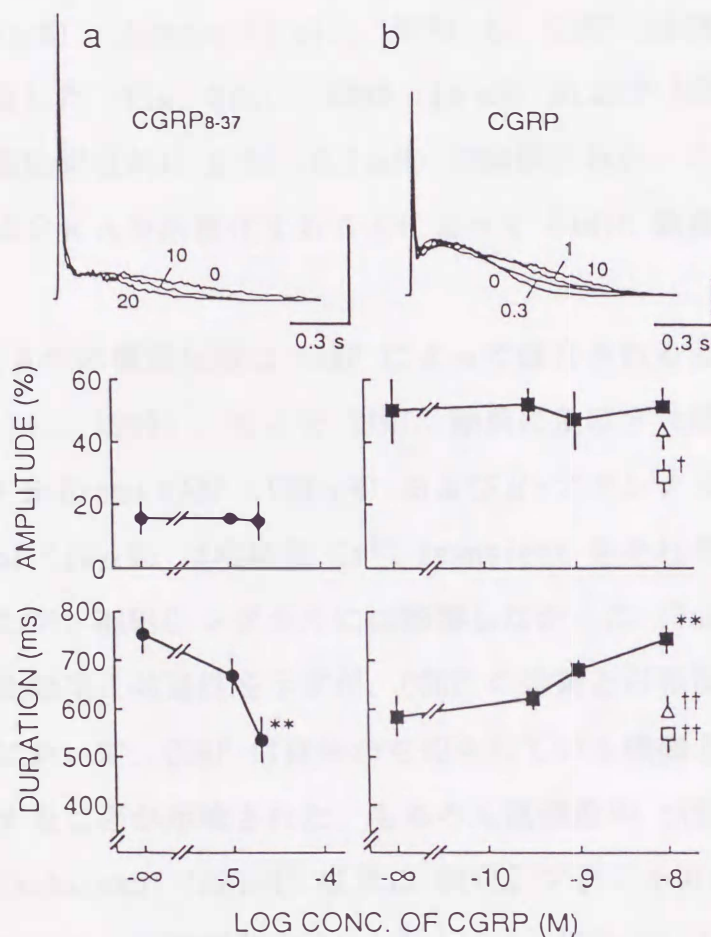


Fig. 20 Involvement of CGRP in RAMIC mobilization in mouse diaphragm muscles treated with  $0.3 \mu\text{M}$  neostigmine. a. Upper: Typical traces of  $\text{Ca}^{2+}$  transients in the presence of CGRP<sub>8-37</sub> at the concentrations indicated ( $\mu\text{M}$ ). Ordinate calibration bars represent 50% amplitude. Middle and lower: Log concentration-response curves of CGRP<sub>8-37</sub> (●) on the peak amplitude and the duration, of RAMIC, respectively. b. Upper: Typical traces in the presence of CGRP (0.3-10 nM). Middle and lower: Log concentration-response curves of CGRP without any blockers (■), with  $0.1 \mu\text{M}$  CGRP<sub>8-37</sub> (Δ) and with  $0.1 \mu\text{M}$  H-89 (□) on the peak amplitude and the duration, of RAMIC, respectively. CGRP<sub>8-37</sub> was preincubated for 90 min before neostigmine was added. Responses to CGRP<sub>8-37</sub> and their control responses to neostigmine alone were examined in nonperfused solution to minimize losses. CGRP was preincubated for 15 min before neostigmine was added. Either  $0.1 \mu\text{M}$  CGRP<sub>8-37</sub> or  $0.1 \mu\text{M}$  H-89 was added 10 min before addition of CGRP. \*\* $P < 0.01$ ; significantly different from the control response to neostigmine alone, by one-way ANOVA (Scheffe multiple-comparison test). † $P < 0.05$  and †† $P < 0.01$ ; significantly different from the effects of CGRP without CGRP<sub>8-37</sub> and H-89, by one-way ANOVA (Scheffe).

(Fig. 21a)。RAMIC の振幅に対する H-89 の  $IC_{50}$  は  $0.14\mu M$  ( $0.07-0.50$ ) であった。H-89 の対照薬である H-85 ( $0.1-1\mu M$ ) は RAMIC に作用しないことが確かめられた。PKA の catalytic subunit ( $10\mu M$ , 細胞内注入) および PKA 活性化剤 AA373 ( $300\mu M$ ) (Kimura et al., 1977) も、CGRP と同様に RAMIC シグナルの持続時間を延長した (Fig. 21b)。CGRP ( $10\text{ nM}$ ) および AA373 ( $300\mu M$ ) による RAMIC 動員の促進効果は共に H-89 ( $0.1\mu M$ ) で抑制された。これらの結果から、神経由来の CGRP は PKA を活性化することによって RAMIC 動員を促進していることが示された。

CGRP から PKA への情報伝達は cAMP によって媒介されると考えられている (Matsumoto et al., 1992)。そこで RAMIC 動員に及ぼす cAMP の影響を検討した。cAMP 関連化合物 8-bromo cAMP ( $100\mu M$ ) および  $\beta$ -アドレナリン受容体アゴニストの isoproterenol ( $10\mu M$ ) は収縮性  $Ca^{2+}$  transient をそれぞれ 1.4 倍および 1.8 倍に増強したが、RAMIC シグナルには影響しなかった (Table 3)。この結果は G 蛋白質の活性化効果と共通性を示すが、CGRP の効果とは相反する。したがって、RAMIC 動員過程において、CGRP は従来から知られている機構とは異なる機構で PKA を活性化することが示唆された。もちろん高濃度の cAMP ( $10\text{ mM}$ , 細胞内注入) および isoproterenol ( $30\mu M$ ) は共に RAMIC シグナルの持続時間を延長した。またホスホジエステラーゼ阻害剤の theophylline ( $100\mu M$ ) も RAMIC の持続時間を延長した。このことから、cAMP を増加させることによって PKA を活性化して RAMIC 動員を間接的に促進し得ることが示された。

以上の結果から、神経由来の CGRP は PKA を直接活性化し、RAMIC 動員を引き起こすことを示し得た。



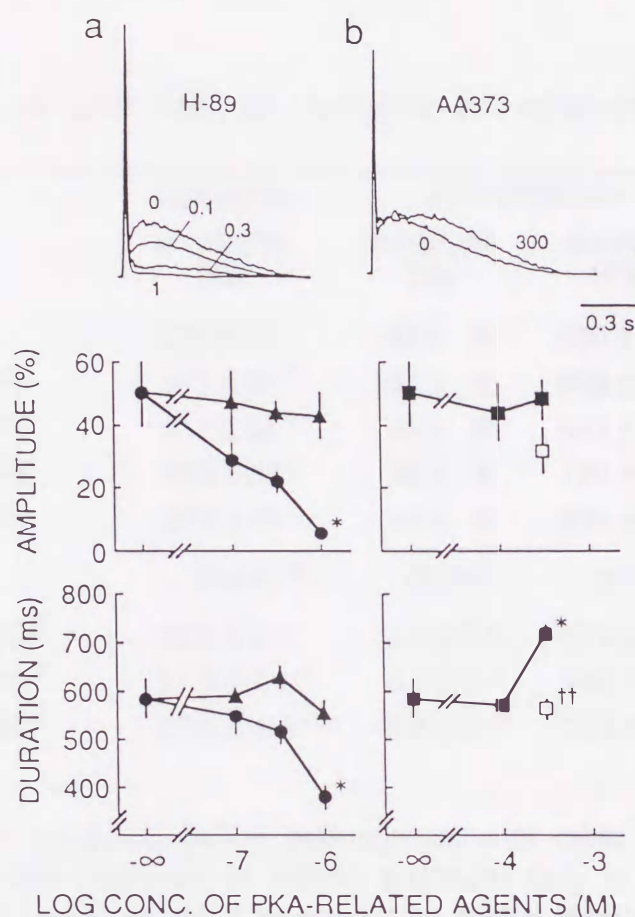


Fig. 21 Involvement of protein kinase A in RAMIC mobilization in mouse diaphragm muscles treated with 0.3  $\mu\text{M}$  neostigmine. a. Upper: Typical traces of  $\text{Ca}^{2+}$  transients in the presence of H-89 at the concentrations indicated ( $\mu\text{M}$ ). Ordinate calibration bar represents 50%. Middle and lower: Log concentration-response curves of H-89 (●) and H-85 (▲) on the peak amplitude and the duration, of RAMIC, respectively. b. Upper: Typical traces in the presence of 300  $\mu\text{M}$  AA373. Middle and lower: Log concentration-response curves of AA373 without (■) and with 0.1  $\mu\text{M}$  H-89 (□) on the peak amplitude and the duration, of RAMIC, respectively. H-89, H-85 and AA373 were pretreated for 30 min before neostigmine was added. 0.1  $\mu\text{M}$  H-89 was added 10 min before addition of AA373. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ ; significantly different from the control response to neostigmine alone, by one-way ANOVA (Scheffe multiple-comparison test). †† $P < 0.01$ , significantly different from the effects of AA373 without H-89, by one-way ANOVA (Scheffe multiple-comparison test).

**Table 3** Influence of cyclic AMP on contractile and noncontractile  $\text{Ca}^{2+}$  transients

Drug	contractile		noncontractile		n
	amplitude (%)		amplitude (%)	duration (ms)	
control <sup>a</sup>	228 ± 25		42 ± 8	560 ± 43	9
8-Br cAMP (100 μM)	317 ± 36 <sup>†</sup>		44 ± 8	609 ± 16	8
isoproterenol (10 μM)	417 ± 35 <sup>**</sup>		48 ± 8	583 ± 36	8
(30 μM)	308 ± 33 <sup>†</sup>		46 ± 8	720 ± 19 <sup>**</sup>	8
theophylline (100 μM)	279 ± 42		41 ± 5	691 ± 22 <sup>**</sup>	16
	(kcps) <sup>b</sup>		(kcps)	(ms)	
cAMP (0 mM) <sup>c</sup>	12.0 ± 2.4		2.2 ± 0.3	574 ± 25	9
(0.3 mM) <sup>c</sup>	27.0 ± 6.0 <sup>*</sup>		3.7 ± 0.7	588 ± 25	10
(10 mM) <sup>c</sup>	32.5 ± 4.8 <sup>**</sup>		3.8 ± 0.7	719 ± 29 <sup>**</sup>	8

<sup>a</sup> Contractile  $\text{Ca}^{2+}$  transients before pretreatment with cyclic AMP (cAMP)-related agents were regarded as 100 % amplitude only in this table, since contractile transients were increased by these agents alone.

<sup>b</sup> Kilocounts per second.  $\text{Ca}^{2+}$  signals before injection of cAMP cannot be obtained. Then data are expressed as absolute luminescence values.

<sup>c</sup> Drug concentrations in an injection pipette.

Statistical differences were evaluated by Student's *t*-test.

\*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$ ; determined by two-tail test.

<sup>†</sup>  $P < 0.05$  represents one-tail significance.



## Ⅳ-2 シナプス前膜のRAMICへの影響

RAMIC 動員を引き起こすためにシナプス前膜から CGRP が遊離されるとき、もう一方の神経伝達物質である ACh の遊離の状態も変化していると考えられたので、この可能性を追究した。K<sup>+</sup>-channel blocker の 4-aminopyridine は運動神経終末からの ACh 遊離を増大させることが知られている (Somogyi et al., 1987)。

Neostigmine (0.3  $\mu$ M) 存在下で 4-aminopyridine (100  $\mu$ M) を投与すると収縮性 Ca<sup>2+</sup> transient および RAMIC シグナルの振幅は増大した (data not shown)。このとき RAMIC の持続時間は変化しなかった。運動神経終末からの ACh 遊離を阻害するボツリヌス毒素 (1-100  $\mu$ g, i.p.) (Stanley and Drachman, 1983) は両タイプの Ca<sup>2+</sup> transient を完全に抑制した。これらの結果から、RAMIC の振幅は ACh 遊離量に依存していることが示された。また RAMIC は、n-ACh 受容体に対する neostigmine の直接作用により生じたものではないことが確かめられた。

Hexamethonium はシナプス前膜の n-ACh 受容体 (神経型) に作用してポジティブフィードバック機構を抑制し、ACh 遊離量を減少させる (Wessler et al., 1986)。Hexamethonium (10-100  $\mu$ M) は収縮性 Ca<sup>2+</sup> transient には影響せず、RAMIC シグナルの振幅を選択的に抑制した (Fig. 22)。IC<sub>50</sub> は 30  $\mu$ M (23.3-38.7) であった。このとき RAMIC の持続時間は変化しなかった。ここで用いた低濃度の hexamethonium は終板の n-ACh 受容体を抑制しない (Milne and Byrne, 1981)。したがって RAMIC 動員を惹起するため、神経筋シナプス間隙に貯留した ACh がシナプス前膜へのポジティブフィードバック機構を活性化し、ACh 遊離を促進していると想定できる。

神経型 n-ACh 受容体の性質は多くの点で RAMIC の特性と合致している。すなわち、1) 神経型 n-ACh 受容体拮抗薬 hexamethonium (10-100  $\mu$ M) が RAMIC 動員を抑制する。2) 神経型 n-ACh 受容体の反応は骨格筋型 n-ACh 受容体と異なり、高濃度外液 Ca<sup>2+</sup> によって増大する (Verino et al., 1992)。これは RAMIC が高濃度 (5 mM) の Ca<sup>2+</sup> によって増大することに対応する。また 3) 神経型 n-ACh 受容体

は cAMP 系により活性型へ変換される (Berg et al., 1989)。他方、RAMIC 動員にも PKA の活性化が不可欠である。したがって神経型 n-ACh 受容体がシナプス後膜にも存在し、RAMIC 動員に寄与している可能性も残されている。

運動神経が過度に ACh を遊離する状態では、運動神経および知覚神経から CGRP が放出される (Sakaguchi et al., 1991)。したがって、シナプス前膜のポジティブフィードバック機構の活性化は、CGRP の放出を引き起こし、RAMIC 動員の駆動を惹起させる可能性が高い。このようにシナプス前膜には RAMIC 動員機構の起動を制御する役割があるといえる。

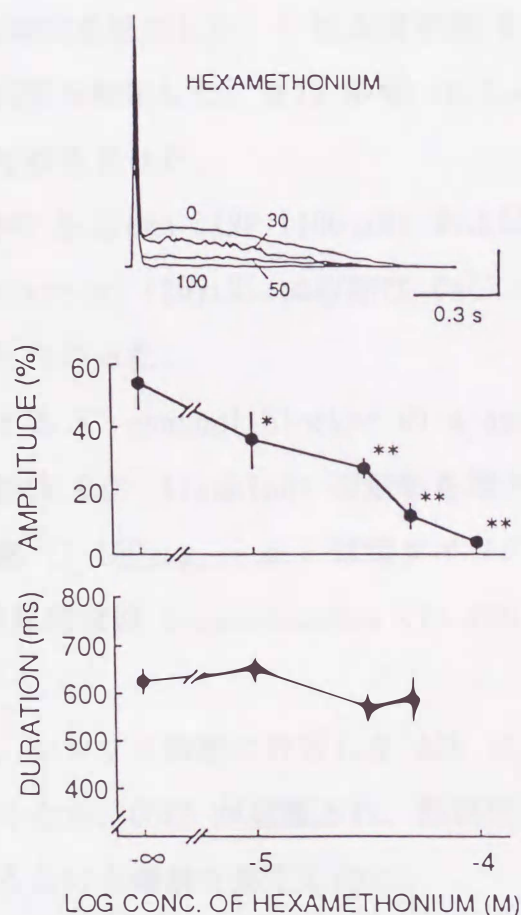


Fig. 22 Involvement of a presynaptic n-ACh receptor in RAMIC mobilization in mouse diaphragm muscles treated with  $0.3\mu\text{M}$  neostigmine. Upper: Typical traces of  $\text{Ca}^{2+}$  transients in the presence of hexamethonium at the concentrations indicated ( $\mu\text{M}$ ). Ordinate calibration bar represents 50% amplitude. Middle and lower: Log concentration-response curves of hexamethonium on the peak amplitude and the duration, of RAMIC, respectively. Increasing concentrations of hexamethonium were added to the neostigmine solution every 5 min after a 15-min application of neostigmine, and the records for 6 signals during the last 1 min were analyzed.  $n = 4$  to 10. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ ; significantly different from the control response to neostigmine alone, by one-way ANOVA (Scheffe multiple-comparison test).



## 【要約】

- (1) 前章で RAMIC 動員機構には P K A が関与していることが示されたので、そのシグナル駆動機構を検討した。
- (2) Neostigmine ( $0.3\mu\text{M}$ ) 存在下において、CGRP ( $0.3\text{--}10\text{ nM}$ ) は RAMIC の持続時間を延長し、CGRP 拮抗薬 CGRP<sub>8-37</sub> ( $10\text{--}20\mu\text{M}$ ) は RAMIC の持続時間を減少した。
- (3) P K A の catalytic subunit ( $10\mu\text{M}$ ) および P K A 活性化剤 AA373 ( $300\mu\text{M}$ ) は RAMIC の持続時間を延長した。P K A 阻害剤 H-89 ( $0.1\text{--}1\mu\text{M}$ ) は RAMIC の振幅および持続時間を抑制した。また H-89 ( $0.1\mu\text{M}$ ) は CGRP による RAMIC 動員の増強効果を消失させた。
- (4) cAMP 関連化合物の 8-bromo cAMP ( $100\mu\text{M}$ ) および  $\beta$ -アドレナリン受容体アゴニストの isoproterenol ( $10\mu\text{M}$ ) は収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient を増強したが RAMIC には影響しなかった。
- (5) ACh 遊離を促進する  $\text{K}^+$ -channel blocker の 4-aminopyridine ( $100\mu\text{M}$ ) は RAMIC および収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient の振幅を増大した。また ACh 遊離阻害剤のボツリヌス毒素 ( $1\text{--}100\mu\text{g}$ , i.p.) は両タイプの  $\text{Ca}^{2+}$  動員を抑制した。神経型 n-ACh 受容体拮抗薬 hexamethonium ( $10\text{--}100\mu\text{M}$ ) は RAMIC の振幅を選択的に抑制した。
- (6) 以上のことから、シナプス間隙に貯留した ACh によってポジティブフィードバック機構が働くとき、CGRP が遊離され、筋細胞内の P K A を活性化した結果 RAMIC を動員するという機構を想定し得た。

## 第V章 脱感作機構におけるRAMIC 動員の役割

### V-1 糖尿病態による n-ACh 受容体の脱感作促進効果

RAMIC は n-ACh 受容体の脱感作が発現しやすい状態において動員される。そこで、脱感作機構における RAMIC 動員の役割を解明する糸口をつかむため、RAMIC シグナルを正常状態と脱感作亢進状態とで比較することに着手した。糖尿病性神経症は神経筋シナプス伝達の異常を引き起こす。このとき骨格筋の n-ACh 受容体機能も修飾される (Kimura et al., 1986)。そこで、まず n-ACh 受容体の脱感作発現速度が糖尿病態で変化しているかどうかを明らかにするため ACh 電位の減衰速度を測定した。また糖尿病態における脱感作促進薬の効果を検討し、受容体の薬物感受性に变化が生じている可能性について調べた。そしてこれらの結果を基に、RAMIC 動員に対する糖尿病態の影響を検討した。

#### 1. 糖尿病態における n-ACh 受容体の脱感作発現速度の上昇

糖尿病態で n-ACh 受容体の脱感作が亢進しているかどうかを明らかにするため、正常筋および STZ 糖尿病態筋における ACh 電位の減衰を比較した。微小電極法を用いて高頻度 (10 Hz) で ACh 電位を発生させると、ACh 電位の振幅は時間とともに減衰した (Fig. 23a)。その減衰は糖尿病態筋によって有意に促進された (Fig. 23b)。この結果より、糖尿病態では脱感作が起こりやすくなっていることが実証された。また 5 Hz の頻度で発生させた ACh 電位の減衰は正常筋、糖尿病態筋ともに僅かであり、糖尿病態による有意な脱感作の促進効果はみられなかった。このように糖尿病態による脱感作促進効果は刺激の頻度に依存して増強するので、糖尿病態は脱感作の完了した状態ではなく、脱感作の発現しやすい状態になっているといえる。



a

NON-DIABETIC



STZ-DIABETIC



b

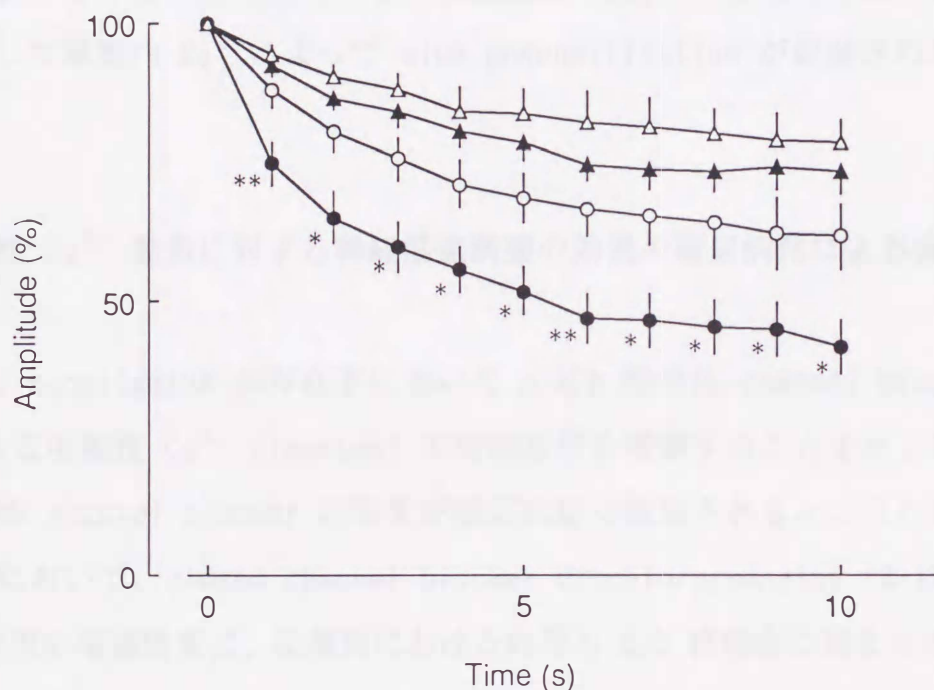


Fig. 23 Desensitization of trains of ACh potentials in non-diabetic and STZ-diabetic diaphragm muscles of mice. a. Typical records showing desensitization in the non-diabetic state (upper) and in the diabetic state (lower). The amplitude of the initial ACh potential was 8 mV, and the potentials were evoked at 10 Hz. b. Time courses of declines in the amplitude of ACh potentials evoked at 5 Hz ( $\Delta$ ) and 10 Hz ( $\circ$ ) in the non-diabetic state, and those which evoked at 5 Hz ( $\blacktriangle$ ) and 10 Hz ( $\bullet$ ) in the diabetic state. Amplitude is expressed as a percentage of the initial ACh potential (approximately 8 mV). Each value is the mean  $\pm$  S.E. of response every 1 min after the beginning of iontophoretic application of ACh.  $n = 7$  to 16.  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ; compared with non-diabetic muscle by unpaired t-test. These desensitization curves can be replotted in two exponential phases and yield the following time constants ( $\tau$ ) of the two kinetic components of desensitization (fast and slow desensitization). Non-diabetic state:  $\tau_f = 0.9$  s,  $\tau_s = 35$  s at 5 Hz, and  $\tau_f = 0.5$  s,  $\tau_s = 18$  s at 10 Hz; STZ-diabetic state:  $\tau_f = 0.7$  s,  $\tau_s = 30$  s at 5 Hz, and  $\tau_f = 0.5$  s,  $\tau_s = 12$  s at 10 Hz.

さらに脱感作発現過程を速度論的に解析した。ACh 電位の時間経過は二つの指数関数で表すことができた。すなわち fast および slow desensitization が観察された。10 Hz で発生させた ACh 電位において fast desensitization の時定数は正常筋、糖尿病態筋ともに 0.5 sec であった。他方、slow desensitization の時定数は正常筋で 18 sec であったのに対し、糖尿病態筋では 13 sec と短くなった。このように糖尿病態は n-ACh 受容体の脱感作発現過程において slow desensitization を選択的に促進することが明らかになった。I 章で述べたとおり、糖尿病態では筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇している可能性がある。また細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  が n-ACh 受容体やシナプス後膜の結合部位に作用すると slow desensitization の速度が増加することが知られている (Chesnut, 1983)。したがって、糖尿病態で異常に蓄積した細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  によって slow desensitization が促進された可能性が高い。

## 2. 収縮性 $\text{Ca}^{2+}$ 動員に対する神経筋遮断薬の効果の糖尿病態による修飾

III 章で、neostigmine 非存在下において n-ACh 受容体-channel blocker は SuCh による収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient の抑制作用を増強することを示した。そこで、この受容体-channel blocker の効果が糖尿病態で修飾されるかどうかを検討した。糖尿病態において、closed channel blocker の chlorpromazine ( $3\text{--}10\mu\text{M}$ ) による SuCh の作用の増強効果は、正常筋における効果の 2/3 倍程度に弱まった (Fig. 24)。また open and closed channel blocker の phencyclidine も、chlorpromazine と同様に、SuCh の抑制作用の増強効果が糖尿病態で減弱した (Fig. 25)。これに対して、open channel blocker の bupivacaine ( $10\text{--}30\mu\text{M}$ ) は正常筋と糖尿病態筋のいずれにおいても同程度に SuCh による収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient の抑制作用を増強した (Fig. 24)。 $\beta$ -Eudesmol は phencyclidine 様の channel blocker である (Kimura et al., 1991a) にも拘らず、病態による抑制を受けなかった (Fig. 25)。これは  $\beta$ -eudesmol の分子構造の特徴と関連しているのであろう。 $\beta$ -Eudesmol は



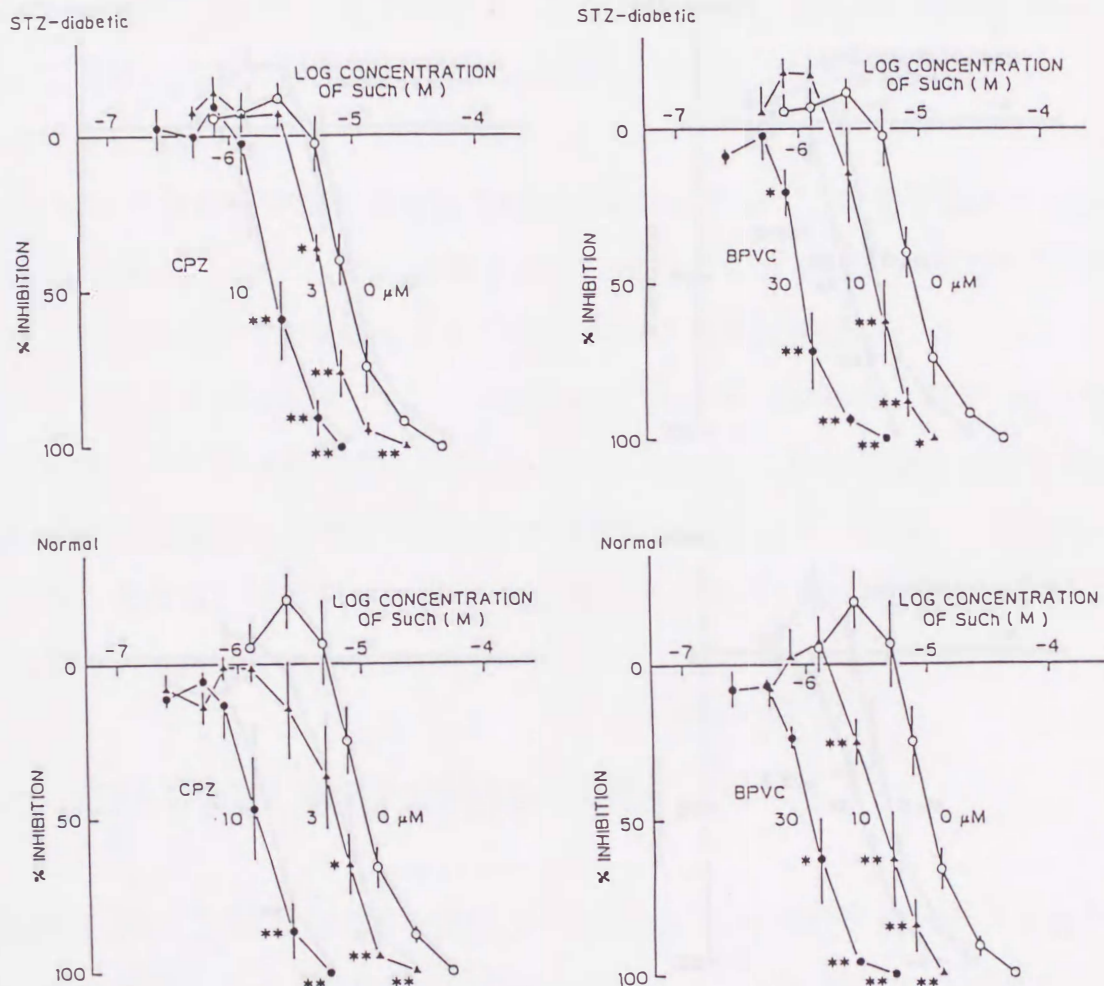


Fig. 24 The enhancing effect of chlorpromazine (CPZ, left) and bupivacaine (BPVC, right) on succinylcholine-induced block of L.AMPLITUDE (contractile  $Ca^{2+}$  transients) in the STZ-diabetic state (upper) and the normal state (lower). The preparations were pretreated with 3 to 30  $\mu$ M CPZ and BPVC for 30 min and compared with the control (O). Each value is the mean  $\pm$  S.E., measured every 7 min after the increase in concentrations of SuCh ( $n = 5-6$ ). \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ ; significantly different from the response without CPZ by Student's unpaired t-test.

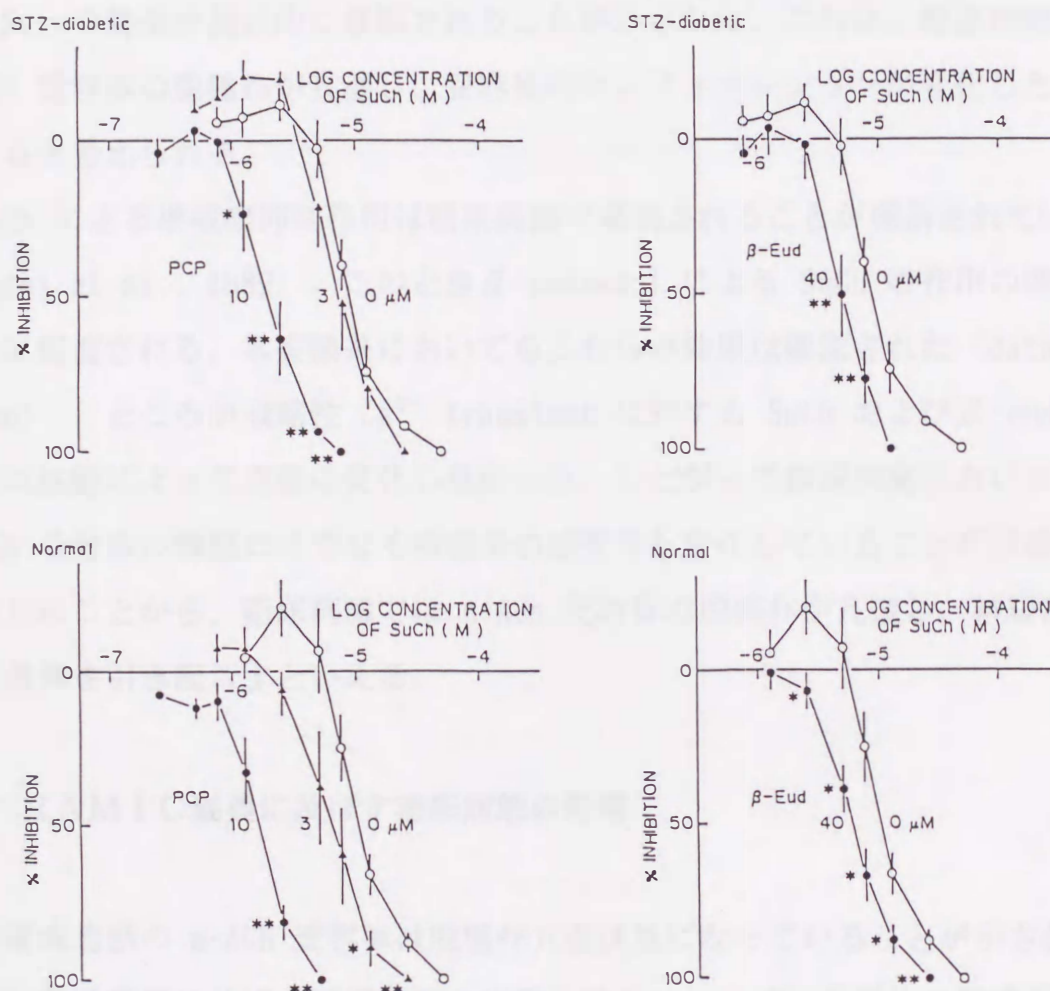


Fig. 25 The enhancing effect of phencyclidine (PCP, left) and  $\beta$ -eudesmol ( $\beta$ -Eud, right) on succinylcholine-induced block of L.AMPLITUDE (contractile  $\text{Ca}^{2+}$  transients) in the STZ-diabetic state (upper) and the normal state (lower). The preparations were pretreated with 3 to 40  $\mu$ M BPVC, PCP and  $\beta$ -Eud for 30 to 60 min and compared with the control (O). Each value is the mean  $\pm$  S.E., measured every 7 min after the increase in concentrations of SuCh ( $n = 5-6$ ). \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ ; significantly different from the response without CPZ by Student's unpaired t-test.



他の三つの channel blocker とは異なり、分子構造中にNを含まず、tertiary-アルコール（分極した部位）を持っているのである（付録2参照）。Channel blocker の効力を比較すると phencyclidine = chlorpromazine > bupivacaine >  $\beta$ -eudesmol (10:10:5:1) であった。このように糖尿病態では closed channel blocker の効果が選択的に修飾されることが示された。これは、糖尿病態において n-ACh 受容体の脱感作が亢進し、受容体のコンフォメーションが変化したことに起因すると考えられる。

SuCh による単収縮抑制作用は糖尿病態で増強されることが報告されている (Muroi et al., 1989)。このとき  $\beta$ -eudesmol による SuCh の作用の増強効果はさらに促進される。本実験系においてもこれらの効果は確認された (data not shown)。ところが収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient に対する SuCh および  $\beta$ -eudesmol の効果は病態によって有意に変化しなかった。したがって糖尿病態においては、n-ACh 受容体の機能だけでなく収縮系の感受性も変化していることが示唆された。

以上のことから、糖尿病態では n-ACh 受容体の脱感作が亢進し、神経筋シナプス伝達異常を引き起こすといえる。

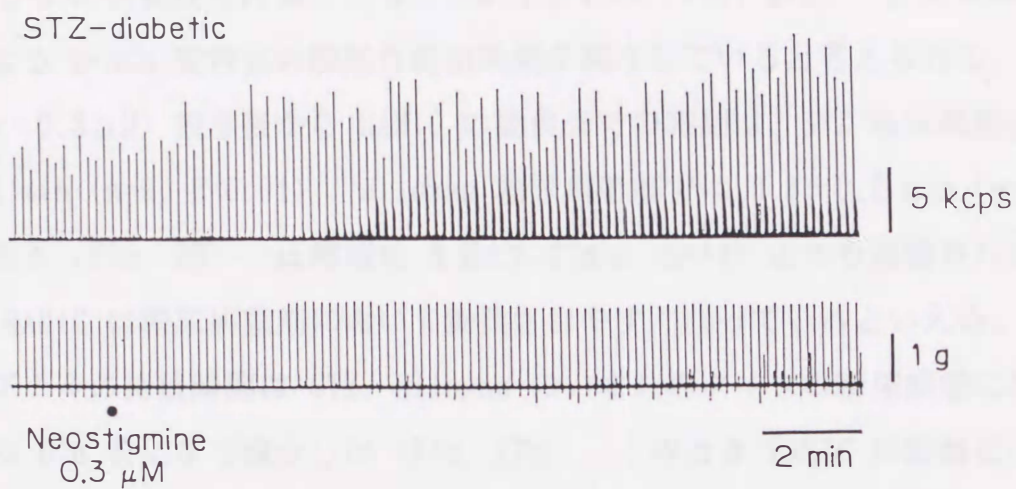
### 3. RAMIC 動員に及ぼす糖尿病態の影響

糖尿病態筋の n-ACh 受容体は脱感作亢進状態になっていることが示されたので、RAMIC 動員機構に及ぼす糖尿病態の影響を検討し、n-ACh 受容体の脱感作と RAMIC 動員との関係について論じた。

#### 3-1 糖尿病態における細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 動員の修飾

STZ および alloxan 糖尿病態筋における細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動員および単収縮を、正常筋における反応と比較した。Fig. 26 で示すように糖尿病態では、neostigmine ( $0.3\mu\text{M}$ ) 処理による収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient および単収縮の増大は僅かであった。このときの収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient の振幅を正常筋の反応と比較すると、糖尿病態

A



B

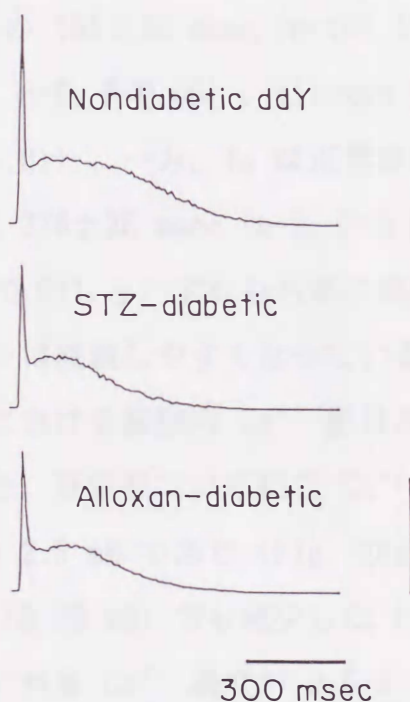


Fig. 26 Diabetic modifications of  $\text{Ca}^{2+}$  transients and twitch tension in the presence of neostigmine ( $0.3\mu\text{M}$ ). a: Typical slow-sweep traces showing the time course of the alterations of  $\text{Ca}^{2+}$  transients (upper) and twitch tension (lower) by the neostigmine treatment in STZ-diabetic diaphragm muscles. The nutrient solution containing neostigmine was continuously perfused from the time point represented by the closed circle. b: Typical fast-sweep traces of averaged records for 30 signals of  $\text{Ca}^{2+}$  transients in diaphragm muscles isolated from non-diabetic (upper), STZ-diabetic (middle), and alloxan-diabetic mice (lower). The signals were averaged 10-15 min after neostigmine was applied.



によって 0.6-0.8 倍程度に抑制されることが示された (Fig. 27a)。この抑制には、糖尿病態による n-ACh 受容体の脱感作促進効果が関与していると考えられる。

Neostigmine ( $0.3\mu\text{M}$ ) 投与後から RAMIC の動員までの時間は、STZ 糖尿病態筋では  $2.7\pm 0.3\text{ min}$  ( $n=9$ ,  $P<0.01$ )、alloxan 糖尿病態筋では  $3.3\pm 0.2\text{ min}$  ( $n=14$ ,  $P<0.05$ ) であり (Fig. 26)、正常筋の  $4.5\pm 0.4\text{ min}$  ( $n=11$ ) よりも短縮された。したがって RAMIC は糖尿病態筋において動員されやすくなっているといえる。

RAMIC シグナルの持続時間は STZ、alloxan のいずれのタイプの糖尿病態においても正常筋の 0.8 倍にまで減少した (Fig. 27c)。このとき RAMIC の振幅には変化がみられなかった (Fig. 27b)。この結果から、糖尿病態において RAMIC の動員量は減少していることが示された。さらに RAMIC の持続時間を  $T_1$  と  $T_2$  に分けて解析した。まず  $T_1$  は正常筋の  $151\pm 10\text{ msec}$  ( $n=10$ ) に対して、STZ 糖尿病態では僅かに減少するが ( $121\pm 10$ ,  $n=9$ ,  $P<0.05$ )、alloxan 糖尿病態では変化しなかった ( $147\pm 14\text{ msec}$ ,  $n=8$ ,  $P<0.01$ )。一方、 $T_2$  は正常筋の  $346\pm 14\text{ msec}$  ( $n=10$ ) に対して、STZ 糖尿病態筋では  $276\pm 26\text{ msec}$  ( $n=9$ ,  $P<0.05$ )、alloxan 糖尿病態筋では  $245\pm 19\text{ msec}$  ( $n=8$ ,  $P<0.01$ ) といずれも有意に減少した。このことは糖尿病態筋において RAMIC シグナルは減衰しやすくなっていることを意味する。

次に neostigmine 存在下における細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動員および単収縮の外液  $\text{Ca}^{2+}$  依存性の変化を検証した。正常筋では収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient、単収縮ともに至適外液  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は通常の  $2.5\text{ mM}$  であり (Fig. 28a)、それより低濃度 ( $0.63\text{--}1.3\text{ mM}$ ) でも高濃度 ( $5\text{--}20\text{ mM}$ ) でも減少した (Fig. 28b, c)。STZ あるいは alloxan 糖尿病態筋では、外液  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が  $2.5\text{--}5\text{ mM}$  の状態で収縮反応が抑制され、低濃度 ( $0.63\text{ mM}$ ) においては逆に増大された。すなわち、糖尿病態筋において収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient は外液  $\text{Ca}^{2+}$  の変動の影響を受けにくくなった。この結果は、筋直接刺激による収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient の外液  $\text{Ca}^{2+}$  依存性を検討した Kimura et al. (1990a) の報告と一致した。このような外液  $\text{Ca}^{2+}$  依存性の低下は、糖尿病態における細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の異常な蓄積が原因であると考えられる。

RAMIC シグナルの正常筋における至適外液  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は  $5\text{ mM}$  である (Kimura

et al., 1989)。RAMIC シグナルの外液  $\text{Ca}^{2+}$  依存性をその振幅と持続時間に分けて詳しく解析したところ、各パラメータはそれぞれ固有の特性を持つことが示された (Fig. 28d, e)。すなわち RAMIC シグナルの振幅は通常の外液  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 (2.5 mM) より低濃度 (0.6-1.3mM) では減少し、高濃度 (5-20 mM) では増大した。これに対し、持続時間は 2.5-5 mM では変化しないが、さらに高濃度側 (10-20 mM) で

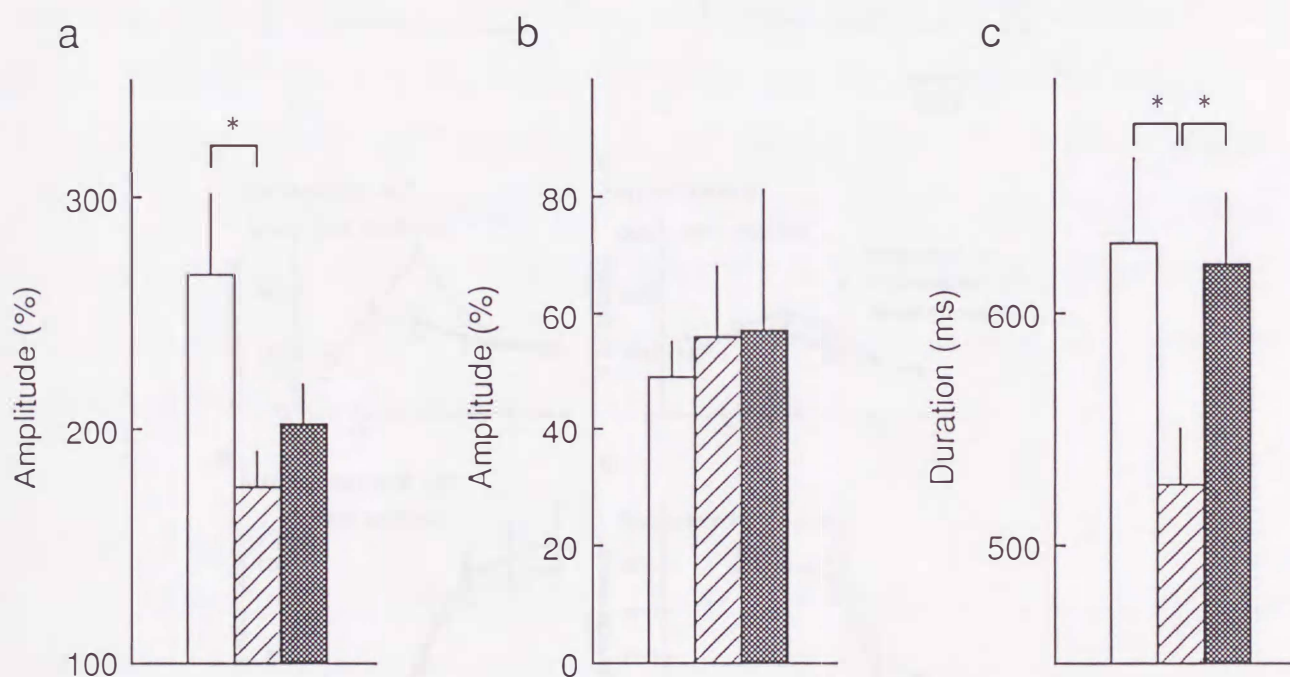


Fig. 27 Diabetic abnormalities of contractile  $\text{Ca}^{2+}$  transients and RAMIC mobilization in the presence of neostigmine ( $0.3\mu\text{M}$ ). (a) Contractile  $\text{Ca}^{2+}$  transients in the diaphragm muscle of non-diabetic (open column), STZ-diabetic (shaded column) and insulin-treated diabetic mice (dotted column). (b and c) Peak amplitude and duration, of RAMIC, respectively. Peak amplitude of either type of  $\text{Ca}^{2+}$  transients was expressed as percentages of contractile  $\text{Ca}^{2+}$  transients obtained before the application of neostigmine.  $n = 4$  to 9. \* $P < 0.05$ ; significantly different from the value for non-diabetic muscles by Student's  $t$ -test.



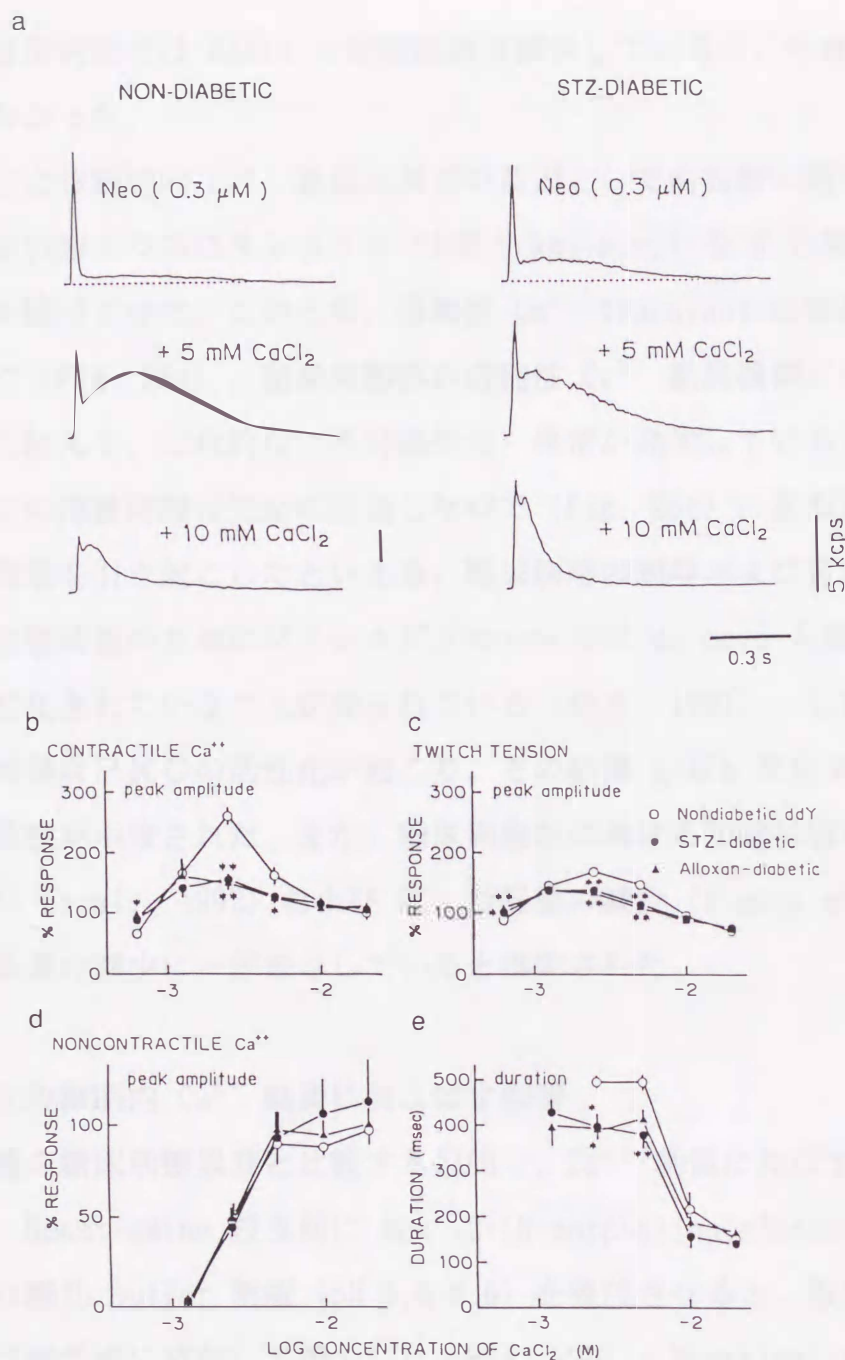


Fig. 28  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  dependency of  $\text{Ca}^{2+}$  transients and twitch tension in the presence of neostigmine ( $0.3\mu\text{M}$ ) in diaphragm muscles of diabetic and non-diabetic mice. a: Typical fast-sweep traces of averaged records for 30 signals of  $\text{Ca}^{2+}$  transients in the non-diabetic state (left) and STZ-diabetic state (right). Upper: response after the application of neostigmine, middle: response at the 2-fold higher  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  (5 mM) and lower: response at the 4-fold higher  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  (10 mM). Log  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  response curves for (b) peak amplitude of contractile  $\text{Ca}^{2+}$  transients, (c) peak amplitude of twitch tension, and (d) peak amplitude and (e) duration of RAMIC observed in the presence of neostigmine in non-diabetic ( $\circ$ ), STZ-diabetic ( $\bullet$ ), and alloxan-diabetic ( $\blacktriangle$ ) state. The data given are means  $\pm$  S.E. of 8 to 9 separate experiments. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ , significantly different from the value for non-diabetic muscles by one-way ANOVA (Scheffe multiple-comparison test).

減少した。糖尿病態では RAMIC の持続時間は減少しているが、外液  $\text{Ca}^{2+}$  依存性は全く変化しなかった。

糖尿病態による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動員の異常の要因として高血糖の関与を検証するため、STZ 糖尿病態マウスにインスリン (100 U/kg, s.c.) を 8 日間頻回投与し、正常血糖状態を維持させた。このとき、収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient の抑制は部分的に緩解されたので (Fig. 26a)、糖尿病態筋の収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  動員機構には高血糖が引き起こす障害に加えて、二次的な (不可逆的な) 異常が発生していると考えられる。他方、RAMIC の持続時間は完全に回復したので (Fig. 26c)、高血糖状態が RAMIC 動員機構に異常を引き起こしたといえる。糖尿病態の網膜および腎糸球体細胞では慢性的な高血糖状態のためにジアシルグリセロールの *de novo* 合成が促進し、PKC が活性化されていることが知られている (柴ら、1991)。したがって骨格筋においても同様な PKC の活性化が起こり、その結果 n-ACh 受容体の脱感作を惹起している可能性が示唆された。また、糖尿病態筋における知覚神経の CGRP 含量の低下 (Diemel et al., 1992) および ACh 遊離量の減少 (Kimura et al., 1993) も RAMIC の動員量の減少に一部寄与していると推定された。

### 3-2 pH 変化の細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 動員におよぼす影響

RAMIC 動員の糖尿病態異変と比較する目的で、 $\text{Ca}^{2+}$  動員に及ぼす酸性状態の影響を検討した。Neostigmine 投与前に Mes (2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid, 5 mM) を含む酸性 buffer 溶液 (pH 5.6-6.6) を灌流させると、収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient は酸性度に依存して増大した (Fig. 29b)。Neostigmine ( $0.3 \mu\text{M}$ ) 投与後、酸性状態で発生した収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient は通常の液性 (pH 7.6) における反応より増大するものの、neostigmine による増加分はむしろ減少した。これらの酸性溶液の効果は可逆的であった。糖尿病態では収縮反応が増強されていることが知られている (Ganguly et al., 1986)。したがって糖尿病性アシドーシスによって収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  動員機構が亢進状態に移行し、neostigmine 処理の影響を受けにくくなるという可能性が考えられる。



一方、RAMIC シグナルにおいては、酸性度に依存してその振幅が抑制された (Fig. 29a, c)。この抑制作用の  $pK$  値は 6.3 であった。このとき RAMIC の持続時間には変化がみられなかった (Fig. 29d)。Torpedo 電気器官膜やマウス骨格筋細胞において n-ACh 受容体チャネルの活性化は酸性条件下で抑制され (Pappone and Barchfeld, 1990; Palma et al., 1991)、脱感作は促進することが報告されて

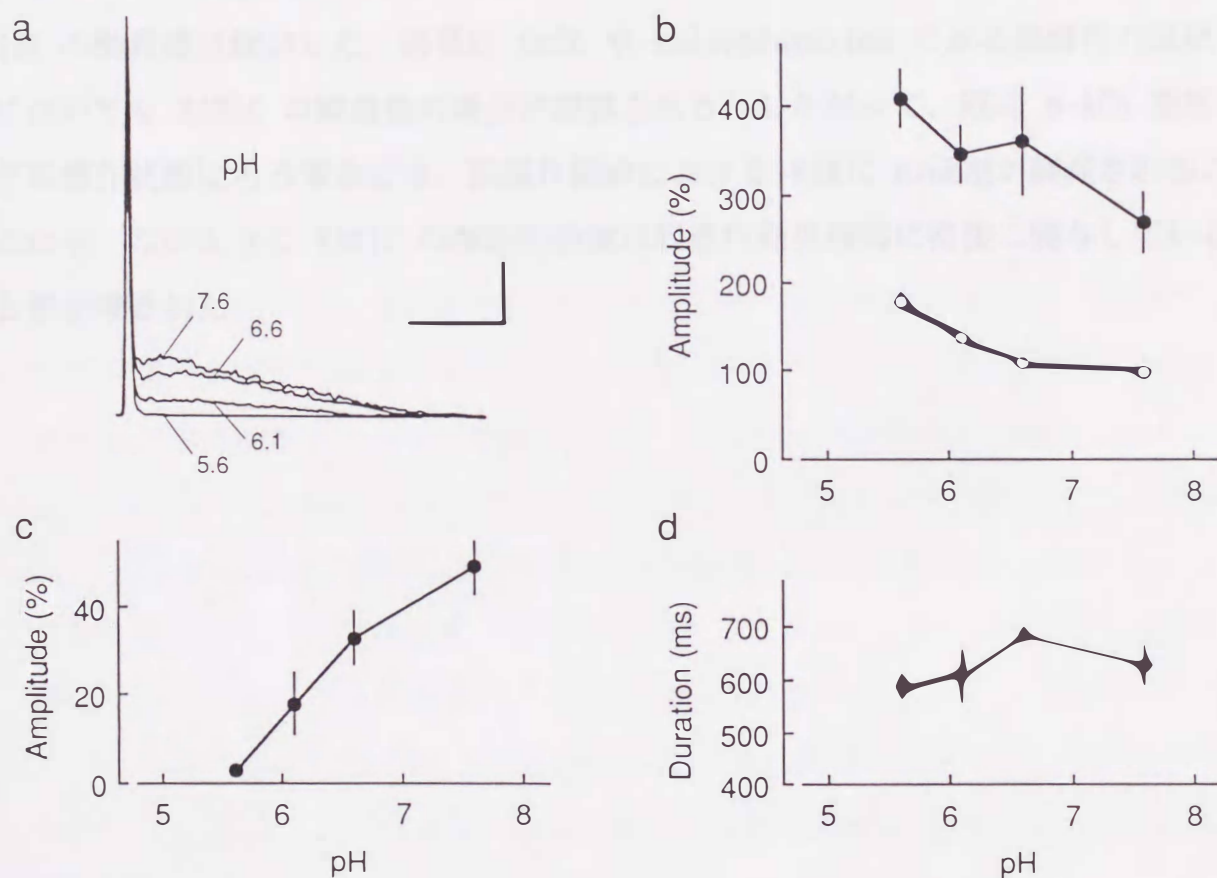


Fig. 29 pH dependence of contractile  $Ca^{2+}$  transient and RAMIC mobilization in non-diabetic diaphragm muscle. (a) Typical traces of averaged records for 30 signals of  $Ca^{2+}$  transients modified by the acidic pH solution. (b) Enhancing effects of pH on contractile  $Ca^{2+}$  transients (○) before the application of neostigmine, and the increase in the contractile  $Ca^{2+}$  transients (●) by the application of neostigmine (0.3  $\mu$ M). (c and d) Effects of pH on peak amplitude and duration, of RAMIC in the presence of neostigmine, respectively.  $n = 4$  to 9.

いる (Li and McNamee, 1992)。したがってRAMIC シグナルの抑制は n-ACh 受容体チャンネルの抑制のためと考えられる。RAMIC に対する酸性溶液の効果は可逆的であった。また RAMIC の抑制様式が糖尿病態と酸性状態とでは異なる。したがって、糖尿病性アシドーシスが直接 RAMIC 動員機構に影響したとは考えにくい、慢性的な酸性状態 (アシドーシス) によって RAMIC 動員機構に二次的な異常が引き起こされている可能性が考えられる。

以上のように糖尿病態では n-ACh 受容体の脱感作が起こりやすい状態となり、RAMIC の動員量は減少した。同様に SuCh や chlorpromazine による脱感作亢進状態においても RAMIC の動員量の減少が観察される。したがって、既に n-ACh 受容体が脱感作状態にある場合には、脱感作機構における RAMIC の役割が軽減されることになる。このように RAMIC の機能的役割は脱感作発現機構に密接に関与していることが示唆された。



## 【要約】

- (1) STZ および alloxan-糖尿病態マウスの横隔膜神経筋標本を用い、糖尿病態による n-ACh 受容体の機能変化を検証した。
- (2) 高頻度 (10 Hz) で ACh 電位を発生させると受容体の脱感作が起こり、ACh 電位の振幅は徐々に減衰する。この減衰は糖尿病態によって促進された。
- (3) Chlorpromazine および phencyclidine は SuCh (13-100  $\mu$ M) による収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient 抑制作用を増強するが、その増強度は糖尿病態において減弱した。Bupivacaine および  $\beta$ -eudesmol の効果は糖尿病態によって修飾されなかった。
- (4) コリンエステラーゼ阻害剤の neostigmine (0.3  $\mu$ M) で処理した糖尿病態筋においては、RAMIC シグナルの減衰速度が速まり、 $T_2$  が減少した。
- (5) Neostigmine 処理による収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient の増強効果は減弱した。
- (6) 糖尿病態マウスにインスリンを投与し正常血糖を維持させると、RAMIC の持続時間は完全に回復した。また収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  動員の減少は部分的に緩解された。
- (7) 正常筋において、酸性 pH (5.6-6.1) は neostigmine (0.3  $\mu$ M) による収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient の増強効果を可逆的に減弱した。このとき RAMIC シグナルの振幅は減少したが持続時間には変化がみられなかった。これらの効果は糖尿病態によって引き起こされる変化と一部類似している。
- (8) このように、糖尿病態では n-ACh 受容体が脱感作亢進状態となり、RAMIC の動員量は減少した。したがって、糖尿病態では脱感作機構における RAMIC の役割が軽減されたと考えられる。

## V-2 RAMIC動員によるPKAとPKCの機能的関係

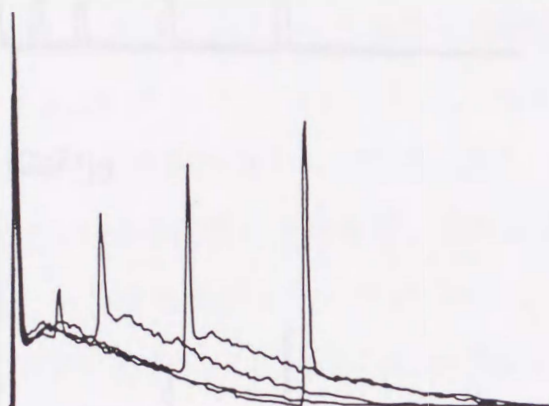
細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇は n-ACh 受容体の脱感作の発現を促進する (Parsons, 1969; Manthey, 1970; Miledi, 1980)。この脱感作促進過程にはPKCによる受容体のリン酸化が介在すると考えられている (Huganir and Greengard, 1990)。前節で、RAMIC が n-ACh 受容体の脱感作機構に関与する可能性が示された。そこで、脱感作機構における RAMIC の機能的役割を明らかにするため、神経を二連パルス刺激し、RAMIC 動員中に発生した収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient に対する RAMIC の直接的な効果を検討した。またIII章で、PKCおよびホスホリパーゼ  $\text{A}_2$  は RAMIC によって活性化されることが示唆されたので、RAMIC の機能発現時にこれらの細胞内情報伝達系が関与しているかどうかを検証した。

マウス横隔膜神経筋標本を neostigmine ( $0.3\mu\text{M}$ ) で処理し、RAMIC が動員される状態において横隔膜神経を二連パルス刺激した。その際、1回目の刺激 (S1) による RAMIC の動員中に、2回目の刺激 (S2) を間隔を変えて与え (150, 300, 600, 1000 msec)、S2 により発生した収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient の振幅について解析した。S2 の収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient はS1の反応に比べて減少したが、刺激間隔を長くするにつれてS2の収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient は回復した (Fig. 30)。Outside-out でパッチクランプした n-ACh 受容体を ACh の二連パルスで刺激したときのチャンネル電流においても、上記の結果と同一の時間経過で脱感作からの回復が起こる (Franke et al., 1992) ことから、S2 の収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient の減少は受容体の脱感作に対応しているといえる。

そこで、この脱感作効果が RAMIC によって引き起こされることを明らかにする目的で、低濃度 ( $0.05\mu\text{M}$ ) の pancuronium によって RAMIC シグナルだけを選択的に抑制し、同様の実験を行った。RAMIC の消失に伴い、S2 の収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient の減少はいずれの刺激間隔においても減弱した (Fig. 30)。また neostigmine 非存在下ではS2の収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient は減少しなかった (data



Neostigmine ( $0.3 \mu\text{M}$ )



+ Pancuronium ( $0.05 \mu\text{M}$ )

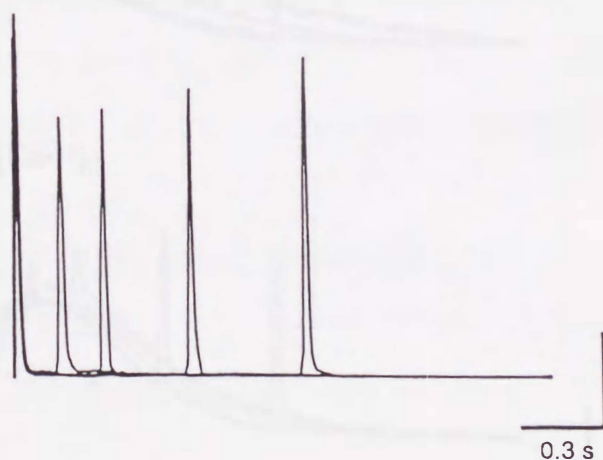
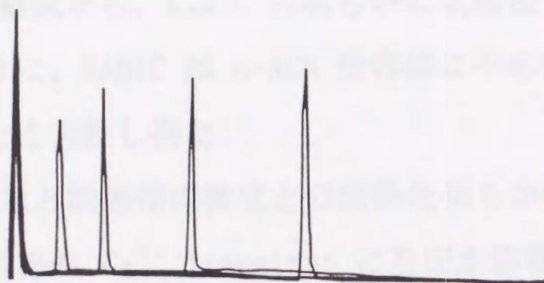
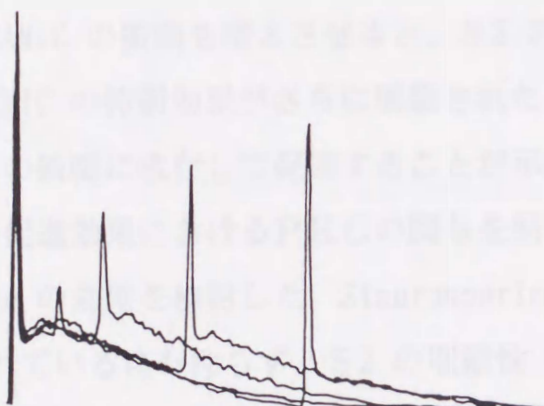


Fig. 30 The functional relation between contractile  $\text{Ca}^{2+}$  transients and RAMIC. Effects of pancuronium on decrease in contractile  $\text{Ca}^{2+}$  transients by RAMIC were investigated. Typical individual traces of averaged records for 30 signals of  $\text{Ca}^{2+}$  transients by double pulse with intervals (msec: 150, 300, 600, 1000) during 8 to 13 min after the application of neostigmine ( $0.3 \mu\text{M}$ ) in the absence (upper) and presence of pancuronium ( $0.05 \mu\text{M}$ , lower) in mouse diaphragm muscles. Pancuronium were treated for 30 min before the application of neostigmine. Data obtained from separate experiments were normalized and superimposed.

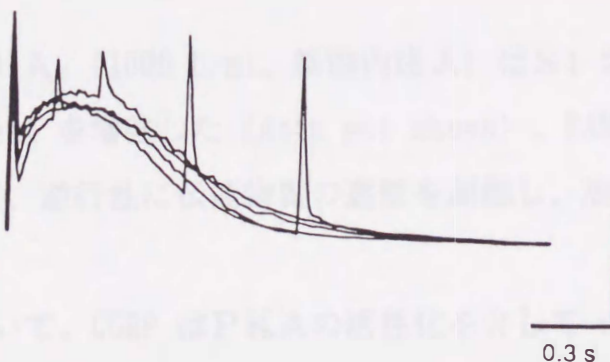
1.25 mM  $[Ca^{2+}]_o$



2.5 mM  $[Ca^{2+}]_o$



5 mM  $[Ca^{2+}]_o$



0.3 s

Fig. 31 The external  $Ca^{2+}$  dependency of the functional relation between contractile  $Ca^{2+}$  transients and RAMIC. Typical individual traces of averaged records for 30 signals of  $Ca^{2+}$  transients by double pulse with intervals (msec: 150, 300, 600, 1000) during 8 to 13 min after the application of neostigmine ( $0.3 \mu M$ ) at low (1.25 mM, upper), normal (2.5 mM, middle) and high  $[Ca^{2+}]_o$  (5 mM, lower) in mouse diaphragm muscles.  $[Ca^{2+}]_o$  was changed at the same time that neostigmine was applied. Data obtained from separate experiments were normalized and superimposed.



not shown)。これらの結果から、RAMIC は明らかに収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  動員を抑制することが示された。このように、RAMIC は n-ACh 受容体に不応性の脱感作を惹起させる役割を果たしていることを実証し得た。

さらに RAMIC の動員量と脱感作の強度との関係を明らかにするため、RAMIC の振幅を変化させ、S2 の収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient に及ぼす影響を検討した。外液  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を Krebs 液の 2.5 mM から 1.25 mM に下げ、RAMIC を消失させると、S2 の収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient の抑制効果が減弱した (Fig. 31)。逆に外液  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を 5 mM に上げ、RAMIC の振幅を増大させると、S2 の収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient に対する RAMIC の抑制効果がさらに増強された。このように、n-ACh 受容体の脱感作は RAMIC の振幅に依存して促進することが示された。

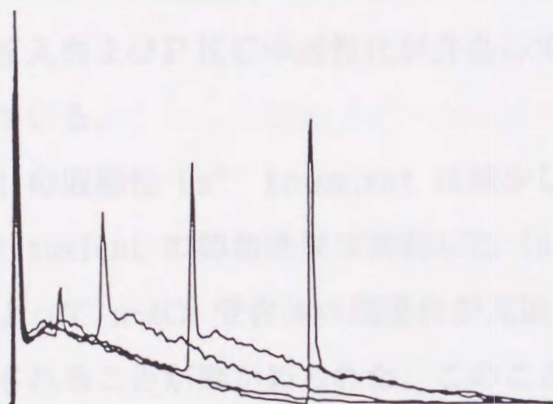
次に RAMIC の脱感作促進効果における PKC の関与を明らかにするため、PKC 阻害剤の staurosporine の効果を検討した。Staurosporine (10 nM) 存在下では、RAMIC が正常に動員されているにも拘らず、S2 の収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient に対する RAMIC の抑制効果が減弱した (Fig. 32)。この結果から、RAMIC は n-ACh 受容体を直接脱感作するのではなく、PKC の活性化を介して間接的に脱感作を惹起することを明らかにした。

一方、ホスホリパーゼ  $\text{A}_2$  (1000 U/ml、細胞内注入) は S1 および S2 のすべての収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient を増強した (data not shown)。RAMIC はホスホリパーゼ  $\text{A}_2$  を活性化した結果、逆行性に伝達物質の遊離を制御し、脱感作を修飾するのであろう。

神経筋シナプスにおいて、CGRP は PKA の活性化を介して n-ACh 受容体の脱感作を促進する (Miles et al., 1989)。一方、このような状態において CGRP は RAMIC 動員機構を駆動し得ることを IV 章で明らかにした。そこで CGRP による脱感作促進効果に RAMIC が介在している可能性を二連パルス法により確かめた。

Neostigmine ( $0.1 \mu\text{M}$ ) 存在下において、CGRP (10 nM) は RAMIC による S2 の収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient の抑制効果を増強し、脱感作促進効果を示した (data not shown)。しかも PKC 阻害剤の staurosporine (3 nM) 存在下では、CGRP による

Neostigmine ( $0.3 \mu\text{M}$ )



+ Staurosporine ( $10 \text{ nM}$ )

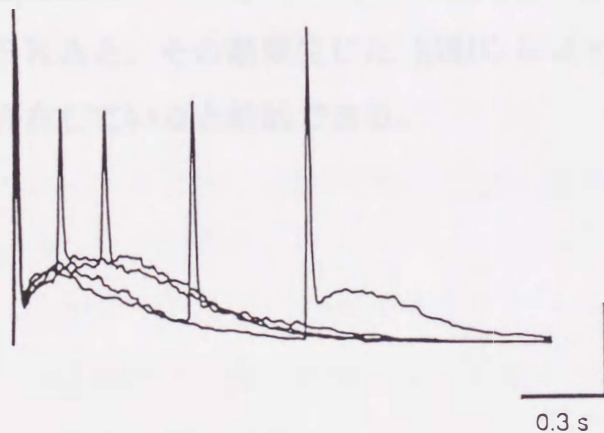


Fig. 32 Diminishing effects of staurosporine on decrease in contractile  $\text{Ca}^{2+}$  transients by RAMIC. Typical individual traces of averaged records for 30 signals of  $\text{Ca}^{2+}$  transients by double pulse with intervals (msec: 150, 300, 600, 1000) during 8 to 13 min after the application of neostigmine ( $0.3 \mu\text{M}$ ) in the absence (upper) and presence of staurosporine ( $10 \text{ nM}$ , lower) in mouse diaphragm muscles. Staurosporine was treated for 30 min before the application of neostigmine. Data obtained from separate experiments were normalized and superimposed.



脱感作促進効果は消失した。したがって、CGRP による脱感作機構の本体はP K Aによる n-ACh 受容体のリン酸化ではなく、RAMIC 動員を介してP K Cによるリン酸化を促進することであるといえる。Nojima et al. (1994) はP K A活性化剤 AA373 による n-ACh 受容体チャネルの脱感作促進効果をパッチクランプ法により検証し、その効果に  $\text{Ca}^{2+}$  の流入およびP K Cの活性化が介在していることを報告しており、上記の結果を裏付けている。

糖尿病態では、S1 の収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient は減少したが、逆に RAMIC による S2 の収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient の抑制効果は減弱した (data not shown)。この結果から、糖尿病態によって n-ACh 受容体の脱感作が亢進した状態においては、RAMIC の役割が軽減されることが確かめられた。このことは、RAMIC による不応性の脱感作機構が、従来から知られている脱感作促進因子による機構とは独立であることを意味している。

以上の結果から、生理的条件下で起こる n-ACh 受容体の脱感作機構には、CGRP により活性化されるP K Aと、その結果生じた RAMIC によって活性化されるP K Cとのクロストークが介在していると結論できる。

## 【要約】

- (1) n-ACh 受容体脱感作機構における RAMIC の機能的役割を明らかにするため、マウス横隔膜神経を二連パルス法で刺激 (S1, S2) し、S2 の収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient に対する S1 の RAMIC の効果を検討した。
- (2) RAMIC 動員中に発生する S2 の収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient は抑制され、RAMIC の減衰に伴い回復した。
- (3) Pancuronium ( $0.05\mu\text{M}$ ) 処理により RAMIC を消失させると、S2 の収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient の減少は弱まった。
- (4) 外液  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を 1/2 倍にして RAMIC を消失させると、S2 の収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient の抑制効果が減弱した。また外液  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を 2 倍にして RAMIC の振幅を増大させると、S2 の収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient に対する RAMIC の抑制効果がさらに増強された。
- (5) PKC 阻害剤 staurosporine (10 nM) 存在下では RAMIC が存在するにも拘らず、収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  に対する抑制効果は減弱した。
- (6) ホスホリパーゼ  $\text{A}_2$  (1000 U/ml、細胞内注入) は S1 および S2 のすべての収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  transient を増強した。
- (7) 以上のことから、RAMIC は PKC の活性化を介して n-ACh 受容体に不応性の脱感作を生じさせ、収縮性  $\text{Ca}^{2+}$  動員を抑制する役割を果たしていることが実証された。n-ACh 受容体の脱感作機構には CGRP により活性化される PKA と、その結果生じた RAMIC によって活性化される PKC とのクロストークが介在していると結論できる。同時に RAMIC はホスホリパーゼ  $\text{A}_2$  を活性化した結果、逆行性に伝達物質の遊離を制御し、脱感作を修飾する可能性が示された。



## 第VI章 考 察

従来の理解では、n-ACh 受容体の脱感作は受容体分子に内在する機構であり、アゴニストと受容体との相互作用だけを問題とした反応であった。したがって CGRP、 $\text{Ca}^{2+}$ 、リン酸化酵素などの内因性脱感作促進物質は必須因子とはみなされず、アゴニストによる効果を修飾する要因として位置づけられていた。しかも脱感作機構は受容体に備わっている機能であるにも拘らず、生理的条件下では発現しない現象と考えられてきた。

本研究では RAMIC の動員機構および機能的役割を解明することにより、n-ACh 受容体の不応性脱感作機構の全貌を明らかにし得た。RAMIC は非生理的な興奮状態において動員されるのではなく、低濃度 ( $0.06\text{--}0.3\mu\text{M}$ ) の neostigmine でコリンエステラーゼ活性を 40-70% 程度抑制し (Chang et al., 1985)、シングルパルスで神経刺激することにより動員させ得る。RAMIC の駆動機構は、シナプス間隙に貯留した ACh が、シナプス後膜および前膜の n-ACh 受容体を持続的に刺激することにより活性化する (Fig. 33)。このときシナプス後膜では外液  $\text{Ca}^{2+}$  が n-ACh 受容体チャネルを介して流入し、筋小胞体とは異なる  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵部位に蓄えられる。一方、シナプス前膜ではポジティブフィードバック機構が働き、CGRP が放出される。CGRP は PKA を直接活性化し、蓄えられていた  $\text{Ca}^{2+}$  を遊離させる。その結果、終板膜直下に RAMIC が動員される。動員された RAMIC は PKC の活性化を介して受容体に不応性の脱感作を生じさせる。このように、神経筋シナプスにおいて PKA 系と PKC 系は連係して n-ACh 受容体の脱感作を制御することが想定できる。

n-ACh 受容体の脱感作は現在アゴニストの効果の速度論的な差異によって、ultrafast, fast, slow および ultraslow desensitization に分類されているに過ぎない。そこで、n-ACh 受容体の脱感作機構を RAMIC の機能的役割別に捉えなおし、脱感作発現過程には以下の三つの段階が存在するという概念を提唱する。まず第1段階は、高濃度のアゴニストのみを繰り返し投与したときに引き起こされる。この段階による脱感作は RAMIC に非依存적であり、生理的には発現しにくい。しかし

SuCh、closed channel blocker、糖尿病態などの脱感作促進剤（因子）の影響を受けることにより、強度の脱感作状態となり得る。第1段階の脱感作が亢進するとRAMICの役割が軽減され、RAMICは抑制されることになる。

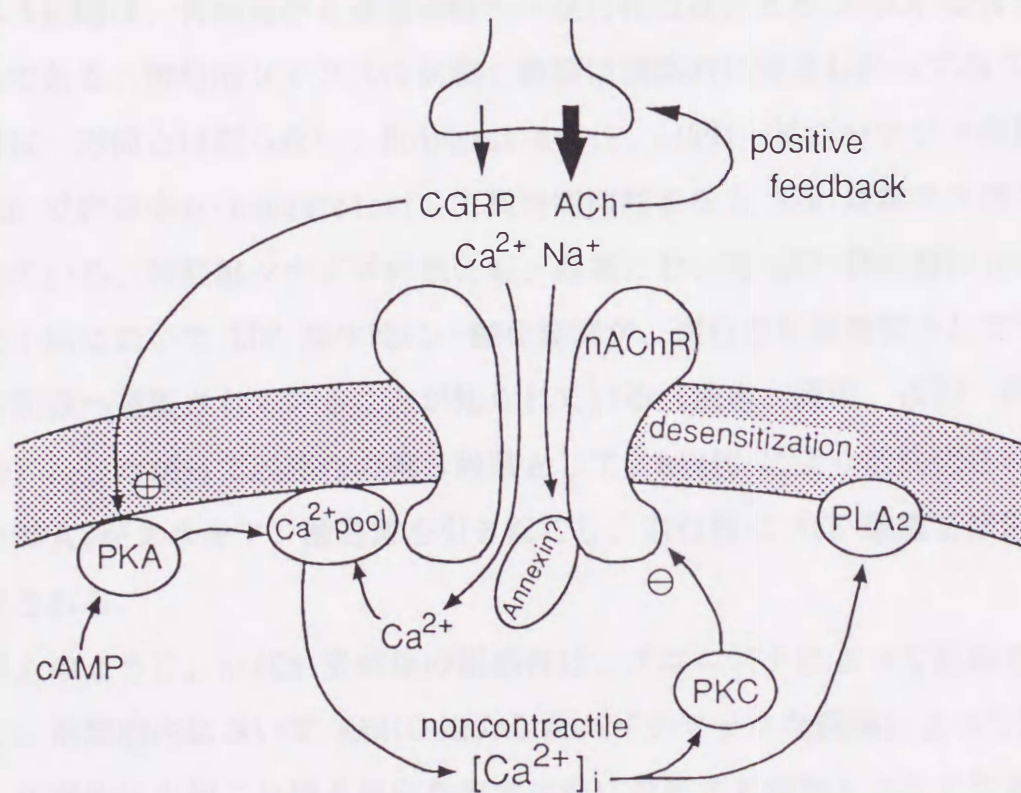


Fig. 33 Putative mechanism of n-ACh receptor desensitization by RAMIC. When ACh is accumulated in the synaptic cleft, CGRP is released during the activation of positive feedback mechanism for ACh release. CGRP activates protein kinase A (PKA) and mobilizes RAMIC from membran-bound  $\text{Ca}^{2+}$  pool, from which the mobilization is stimulated by  $\text{Ca}^{2+}$  influx through n-ACh receptor-channel. RAMIC promotes the protein kinase C (PKC) activation. Protein kinase C phosphorylates the n-ACh receptor, inducing the receptor desensitization. Thus, the protein kinase A system may cooperate with the protein kinase C system to promote n-ACh receptor desensitization. Phospholipase  $\text{A}_2$  may modulate the desensitization through retrograde regulation of transmitter release at the neuromuscular junction.



第2段階は、本研究で明らかにされた不応性の脱感作である。上述のように、運動神経由来の ACh がシナプス間隙に貯留したとき、動員された RAMIC によって引き起こされ、その脱感作機構には PKA と PKC とのクロストークが介在している。この第2段階はアゴニストによる脱感作効果の増幅機構として働き、脱感作の発現を容易にしていると考えられる。

第3段階は、骨格筋から運動神経への逆行性伝達による n-ACh 受容体の脱感作の修飾である。神経筋シナプスの前膜と後膜は機能的に関連し合っており、シナプス伝達は一方向とは限らない。Molenaar et al. (1991) は、シナプス後膜の n-ACh 受容体を  $\alpha$ -bungarotoxin で長時間抑制すると ACh 遊離が亢進することを報告している。神経筋シナプスの他にも、海馬において LTP 発生時にアラキドン酸が、また小脳において LDP 発生時に一酸化窒素が、逆行性伝達物質としてシナプス後膜から前膜へ遊離されていることが知られている（渋谷、岡田, 1990; 岡田、杉山, 1990）。したがって脱感作の第3段階として、RAMIC により活性化されたホスホリパーゼ  $A_2$  がアラキドン酸遊離を引き起こし、逆行性に ACh 遊離を修飾する機構が想定される。

以上のように、n-ACh 受容体の脱感作は、アゴニストによって惹起されるだけでなく、筋細胞内において RAMIC を介したダイナミックな機構によって制御されており、生理的にも起こり得る異常な興奮状態に対処する細胞レベルの生体防御機構であると結論できる。

## 総 括

マウス横隔膜筋をコリンエステラーゼ阻害剤存在下で神経刺激して、n-ACh 受容体の脱感作が起こりやすい状態を再現させ、そのとき生じる RAMIC の動員機構を解明し、以下の結論を得た。

- 1) RAMIC は従来から知られている筋小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離とは独立に動員される。その動員の駆動には、ACh による持続的な n-ACh 受容体の活性化と同時に、CGRP による筋細胞内 PKA の活性化が起こることを見いだした。
- 2) 動員された RAMIC は、PKC の活性化を介して受容体の不応性脱感作を惹起する。さらに RAMIC はホスホリパーゼ  $\text{A}_2$  を活性化した結果、逆行性に伝達物質の遊離を制御し、脱感作を修飾する可能性が示された。
- 3) n-ACh 受容体の脱感作亢進状態においては、脱感作機構における RAMIC の役割が軽減される。

以上のように、RAMIC を介して cAMP (PKA) 系と  $\text{Ca}^{2+}$  (PKC) 系とが一連の機構として働き、n-ACh 受容体の脱感作を制御するという新しい概念を示し得た。



## 参考文献

- Adamo, S., Zani, B.M., Nervi, C., Senni, M.I., Molinaro, M. and Eusebi, F.: Acetylcholine stimulates phosphatidylinositol turnover at nicotinic receptors of cultured myotubes. *FEBS Lett.* **190**, 161-164 (1985).
- Adams, P.R.: A study of desensitization using voltage clamp. *Pflügers Arch.* **360**, 135-144 (1975).
- Aguayo, L.G., Witkop, B. and Alubquerque, E.X.: Voltage- and time-dependent effects of phencyclidines on the endplate current arise from open and closed channel blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3523-3527 (1986).
- Albuquerque, E.X., Daly, J.W. and Warnick, J.E.: Macromolecular sites for specific neurotoxins and drugs on chemosensitive synapses and electrical excitation in biological membranes. *In* *Ion Channels*, ed. by T. Narahashi, Vol. 1, pp.95-162, Plenum Press, New York (1988).
- Andreasen, T.J., Doerge, D.R. and McNamee, M.G.: Effects of phospholipase A<sub>2</sub> on the binding and ion permeability control properties of the acetylcholine receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* **194**, 468-480 (1979).
- Anywyl, R. and Narahashi, T.: Desensitization of the acetylcholine receptor of denervated rat soleus muscle and the effect of calcium. *Br. J. Pharmacol.* **69**, 91-98 (1980).
- Aracava, Y., Ikeda, S.R., Daly, J.W., Brookes, N. and Albuquerque, E.X.: Interactions of bupivacaine with ionic channels of the nicotinic receptor, Analysis of single-channel currents. *Mol. Pharmacol.* **26**, 304-313 (1984).
- Axelrod, J., Burch, R.M. and Jelsema, C.L.: Receptor-mediated activation of phospholipase A<sub>2</sub> via GTP-binding proteins: arachidonic acid and its metabolites as second messengers. *Trends Neurosci.* **11**, 117-123 (1988).
- Bazzi, M.D. and Nelsestuen, G.L.: Constitutive activity of membrane-inserted protein kinase-C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **152**, 336-343 (1988).
- Berg, D.K., Boyd, R.T., Halvorsen, S.W., Higgins, L.S., Jacob, M.H. and Margiotta, J.F.: Regulating the number and function of neuronal acetylcholine receptors. *Trends Neurosci.* **12**, 16-21 (1989).

- Bowman, W.C. (Ed.): Pharmacological manipulation of prejunctional events. *In Pharmacology of Neuromuscular Function*. 2nd ed., Butterworth, London, pp.65-99 (1990).
- Boyd, N.D.: Two distinct kinetic phases of desensitization of acetylcholine receptors of clonal rat PC12 cells. *J. Physiol.* 389, 45-67 (1987).
- Boyd, N.D. and Cohen, J.B.: Kinetics of binding of [ $^3\text{H}$ ]acetylcholine and [ $^3\text{H}$ ]carbamoylcholine to Torpedo postsynaptic membranes: Slow conformational transitions of the cholinergic receptor. *Biochemistry* 19, 5344-5353 (1980).
- Boyd, N.D. and Cohen, J.B.: Desensitization of membrane-bound Torpedo acetylcholine receptor by amine noncompetitive antagonists and aliphatic alcohols: Studies of [ $^3\text{H}$ ] acetylcholine binding and  $^{22}\text{Na}^+$  ion fluxes. *Biochemistry* 23, 4023-4033 (1984).
- Brisson, A. and Unwin, P.N.T.: Quaternary structure of the acetylcholine receptor. *Nature* 315, 474-477 (1985).
- Burd, P.F. and Ferry, C.B.: A prolonged contraction at the end-plate region of the diaphragm of rats and mice after anticholinesterases in vitro. *J. Physiol.*, 391, 429-440 (1987).
- Carp, J.S., Aronstam, R.S., Witkop, B. and Alubiquerque, E.X.: Electrophysiological and biochemical studies on enhancement of desensitization by phenothiazine neuroleptics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 310-314 (1983).
- Castillo, J.D. and De Motta, G.E.: A new method for excitation-contraction uncoupling in frog skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 78, 782-784 (1978).
- Chang, C.C., Chen, S.M. and Hong, S.J.: Reversals of the neostigmine-induced tetanic fade and endplate potential run-down with respect to the autoregulation of transmitter release. *Br. J. Pharmacol.* 95, 1255-1261 (1988).
- Chang, C.C., Chiou, L.C. and Hwang, L.L.: Selective antagonism to succinylcholine-induced depolarization by  $\alpha$ -bungarotoxin with respect to the mode of action of depolarizing agents. *Br. J. Pharmacol.* 98, 1413-1419 (1989).
- Chang, C.C., Hong, S.J., Lin, H.-L. and Su, M.J.: Acetylcholine hydrolysis



- during neuromuscular transmission in the synaptic cleft of skeletal muscle of mouse and chick. *Neuropharmacol.* 24, 533-539 (1985).
- Chang, C.C. and Hong, S.J.: A regenerating release of acetylcholine from mouse motor nerve terminals treated with anticholinesterase agents. *Neurosci. Lett.* 69, 203-207 (1986).
- Chang, H.W. and Neumann, E.: Dynamic properties of isolated acetylcholine receptor proteins: Release of calcium ions caused by acetylcholine binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 3364-3368 (1976).
- Changeux, J.-P., Devillers-Thiery, A. and Chemouilli, P.: Acetylcholine receptor proteins: An allosteric protein. *Science* 225, 1335-1345 (1984).
- Chao, T.T., Ianuzzo, C.D., Armstrong, R.B., Albright, J.T. and Anapolle, S. E.: Ultrastructural alterations in skeletal muscle fibers of streptozotocin-diabetic rats. *Cell Tiss. Res.* 168, 239-246 (1976).
- Cheah, A.M.: Effect of long chain unsaturated fatty acids on the calcium transport of sarcoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta.* 648, 113-119 (1981).
- Chesnut, T.J.: Two-component desensitization at the neuromuscular junction of the frog. *J. Physiol.* 336, 229-241 (1983).
- Chijiwa, T., Mishima, A., Hagiwara, M., Sand, M., Hayashi, K., Inoue, T., Naito, K., Toshioka, T. and Hidaka, H.: Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino) ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.* 265, 5267-5272 (1990).
- Csillik, B., Tajti, L., Kovacs, T., Kukla, E., Pakic, P. and Kntihar-Csillik, E.: Distribution of calcitonin gene-related peptide in vertebrate neuromuscular junctions: relationship to the acetylcholine receptor. *J. Histochem. Cytochem.* 41, 1547-1555 (1993).
- Claudio, T., Green, W.N., Hartmann, D.S., Hayden, D., Paulson, H.L., Sigworth, F.J., Sine, S.M. and Swedlund, A.: Genetic reconstitution of functional acetylcholine receptor channels in mouse fibroblasts. *Science* 238, 1688-1694 (1987).
- Cleland, P.J.F., Appleby, G.J., Rattigan, S. and Clark, M.G.: Exercise-

- induced translocation of protein kinase C and production of diacylglycerol and phosphatidic acid in rat skeletal muscle in vivo. *J. Biol. Chem.* 264, 17704-17711 (1989).
- Cohen, J.B., Weber, M. and Changeux, J.-P.: Effects of local anesthetics and calcium on the interaction of cholinergic ligands with the nicotinic receptor protein from *Torpedo marmorata*. *Mol. Pharmacol.* 10, 904-932 (1974).
- Colquhoun, D.: On the principles of postsynaptic action of neuromuscular blocking agents. *In* *Handb. Exp. Pharmacol.* 52, 59-113 (1986).
- Colquhoun, D. and Sakmann, B.: Fluctuations in the microsecond time range of the currents through single acetylcholine receptor channels. *Nature* 294, 464-466 (1981).
- Constantini, S., Schiller, Y., Cohen, A.M. and Rahamimoff, R.: Pathophysiology of the neuromuscular junction in diabetic rats. *Israel J. Med. Sci.* 23, 101-106 (1987).
- Couturier, S., Bertrand, D., Matter, J.M., Hernandez, M.C., Bertrand, S., Millar, N., Valera, S., Barkas, T. and Ballivet, M.: A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit ( $\alpha 7$ ) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by  $\alpha$ -BTX. *Neuron* 5, 847-856 (1990).
- Decker, E.R. and Dani, J.A.: Calcium permeability of the nicotinic acetylcholine receptor: The single-channel calcium influx is significant. *J. Neurosci.* 10, 3413-3420 (1990).
- Deneris, E.S., Connolly, J., Rogers, S.W. and Duvoisin, R.: Pharmacological and functional diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 34-40 (1991).
- Devillers-Thiery, A., Giraudat, J., Bentaboulet, M. and Changeux, J.-P.: Complete mRNA coding sequence of the acetylcholine binding  $\alpha$ -subunit of *torpedo marmorata* acetylcholine receptor: A model for the trans-membrane organization of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2067-2071 (1983).
- Diemel, L.T., Stevens, E.J., Willars, G.B. and Tomlinson, D.R.: Depletion of substance P and calcitonin gene-related peptide in sciatic nerve of rats with experimental diabetes: effects of insulin and aldose



- reductase inhibition. *Neurosci. Lett.* 137, 253-256 (1992).
- Dionne, V.E., Steinbach, J.H. and Stevens, C.F.: Analysis of the dose-response relationship at voltage-clamped frog neuromuscular junctions. *J. Physiol.* 281, 421-444 (1978).
- Dunn, S.M. and Raftery, M.A.: Activation and desensitization of Torpedo acetylcholine receptor: Evidence for separate binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6757-6761 (1982).
- Eldefrawi, A.T., Miller, E.R. and Eldefrawi, M.E.: Binding of depolarizing drugs to the ionic channel sites of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochem. Pharmacol.* 31, 1819-1822 (1982).
- Eusebi, F., Grassi, F., Molinaro, M., and Zani, B.M.: Acetylcholine regulation of nicotinic receptor channels through a putative G protein in chick myotubes. *J. Physiol.* 393, 635-645 (1987a).
- Eusebi, F., Grassi, F., Nervi, C., Caporale, C., Adamo, S., Zani, B.M. and Molinaro, M.: Acetylcholine may regulate its own nicotinic receptor-channel through the C-kinase system. *Proc. R. Soc. Lond. B* 230, 355-365 (1987b).
- Feltz, A. and Trautmann, A.: Desensitization at the frog neuromuscular junction: a biphasic process. *J. Physiol.* 322, 257-272 (1982).
- Ferrer-Montiel, A.V., Montal, M.S., Diaz-Munoz, M. and Montal, M.: Agonist-independent activation of acetylcholine receptor channels by protein kinase A phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10213-10217 (1991).
- Fiekers, J.F., Spannbauer, P.M., Scubon-Mucieri, B. and Parsons, R.L.: Voltage dependence of desensitization: Influence of calcium and activation kinetics. *J. Gen. Physiol.* 75, 511-529 (1980).
- Finer-Moore, J. and Stroud, R.M.: Amphipathic analysis and possible formation of the ion channel in an acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 155-159 (1984).
- Franke, C., Hatt, H., Parnas, H. and Dudel, J.: Recovery from the rapid desensitization of nicotinic acetylcholine receptor channels on mouse muscle. *Neurosci. Lett.* 140, 169-172 (1992).
- Ganguly, P.K., Mathur, S., Gupta, M.P., Beamish, R.E. and Dhalla, N.S.: Calcium pump activity of sarcoplasmic reticulum in diabetic rat

- skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 251, E515-E523 (1986).
- Giniatullin, R.A., Khamitov, G., Khazipov, R., Magazanik, L.G., Nikolsky, E.E., Snetkov, V.A. and Vyskocil, F.: Development of desensitization during repetitive end-plate activity and single end-plate currents in frog muscle. *J. Physiol.* 412, 113-122 (1989).
- Giraudat, J., Dennis, M., Heidmann, T., Chang, J.-Y. and Changeux, J.-P.: Structure of the high-affinity binding site for noncompetitive blockers of the acetylcholine receptor: Ser-264 of the  $\delta$  subunit is labeled by [ $^3\text{H}$ ]chlorpromazine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2719-2723 (1986).
- Grassi, F., Giovannelli, A., Fucile, S. and Eusebi, F., Activation of the nicotinic acetylcholine receptor mobilizes calcium from caffeine-insensitive stores in C2C12 mouse myotubes, *Pflügers Arch.*, 422, 591-598 (1993).
- Grassi, F., Monaco, L. and Eusebi, F.: Acetylcholine receptor channel properties in rat myotubes exposed to forskolin. *Biochem. Biophys. Res. Commn.* 147, 1000-1007 (1987).
- Grossie, J.: Contractile and electrical characteristics of extensor muscle from alloxan-diabetic rats. *Diabetes* 31, 194-202 (1982).
- Hardwick, J.C., Coniglio, L.M. and Parsons, R.L.: Staurosporine inhibits the extent of acetylcholine receptor recovery from carbachol-induced desensitization in snake twitch fibers. *Br. J. Pharmacol.* 104, 879-886 (1991).
- Heidmann, T. and Changeux, J.-P.: Fast kinetic studies on the interaction of a fluorescent agonist with the membrane-bound acetylcholine receptor from *Torpedo marmorata*. *Eur. J. Biochem.* 94, 255-279 (1979).
- Heidmann, T. Oswald, R.E. and Changeux, J.-P.: Multiple sites of action for noncompetitive blockers on acetylcholine receptor rich membrane fragments from *Torpedo marmorata*. *Biochemistry* 22, 3112-3127 (1983).
- Hidaka, H., Yamaki, T., Naka, M., Tanaka, T., Hayashi, H. and Kobayashi, R.: Calcium-regulated modulator protein interacting agents inhibit smooth muscle calcium-stimulated protein kinase and ATPase. *Mol. Pharmacol.* 17, 66-72 (1980).
- Higgins, L.S. and Berg, D.K.: Cyclic AMP-dependent mechanism regulates



- acetylcholine receptor function on bovine adrenal chromaffin cells and discriminates between new and old receptors. *J. Cell Biol.* 107, 1157-1165 (1988).
- Hong, S.J. and Chang, C.C.: Transmitter-mediated local contracture of the endplate region of the focally innervated mouse diaphragm treated with anticholinesterase. *Br. J. Pharmacol.*, 109, 1178-1185 (1993).
- Hopfield, J.F., Tank, D.W., Greengard, P. and Huganir, R.L.: Functional modulation of the nicotinic acetylcholine receptor by tyrosine phosphorylation. *Nature* 336, 677-680 (1988).
- Huganir, R.L., Delcour, A.H., Greengard, P. and Hess, G.P.: Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor regulates its rate of desensitization. *Nature* 321, 774-776 (1986).
- Huganir, R.L. and Greengard, P.: Regulation of neurotransmitter receptor desensitization by protein phosphorylation. *Neuron*, 5, 555-567 (1990).
- Huganir, R.L. and Greengard, P.: cAMP-dependent protein kinase phosphorylates the nicotinic acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1130-1134 (1983).
- Huganir, R.L., Miles, K. and Greengard, P.: Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor by an endogenous tyrosine-specific protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6968-6972 (1984).
- Hwang, K.S., Saida, K. and Breeman, C.: Modulation of ryanodine-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in amphibian skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142, 674-679 (1987).
- Kao, P.N., Dwork, A.J., Kaldany, R.-R.J., Silver, M.S., Widman, J., Stein, S. and Karlin, A.: Identification of the  $\alpha$ -subunit half-cystein specifically labeled by an affinity reagent for the acetylcholine receptor binding site. *J. Biol. Chem.* 259, 11662-11665 (1984).
- Katz, B. and Thesleff, S.: A study of "desensitization" produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J. Physiol.* 138, 63-80 (1957).
- Kimura, M., Kimura, I., Fujihara, M. and Hoshino, N.: Diabetic state-induced modifications of succinylcholine binding mode in the microsomal fractions of mouse skeletal muscles. *Life Sci.* 42, 1029-1036 (1988a).
- Kimura, I., Kimura, M. and Kimura, M.: Modification by dantrolene,

- procaine and suxamethonium of caffeine-induced changes in aequorin luminescence transients and twitch tensions of directly-stimulated diaphragm muscle of mouse. *Br. J. Pharmacol.* 86, 319-326 (1985).
- Kimura, I., Kimura, M. and Kimura, M.: Increase in electrically-stimulated  $\text{Ca}^{2+}$  release and suppression of caffeine response in diaphragm muscle of alloxan-diabetic mice compared with the denervation effect. *Diabetologia* 33, 72-76 (1990a).
- Kimura, M., Kimura, I., Nojima, H. and Muroi, M.: Diabetes Mellitus-induced hypersensitivity of mouse skeletal muscles to acetylcholine and succinylcholine. *Jpn. J. Pharmacol.* 40, 251-256 (1986).
- Kimura, I., Kondoh, T. and Kimura, M.: Postsynaptic nicotinic acetylcholine receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$  transients with neostigmine in phrenic nerve-diaphragm muscles of mice. *Brain Res.* 507, 309-311 (1989).
- Kimura, I., Kondoh, T. and Kimura, M.: Changes in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  produced in the mouse diaphragm by neuromuscular blocking drugs. *J. Pharm. Pharmacol.* 42, 626-631 (1990b).
- Kimura, M., Kimura, I. and Kobayashi, S.: The activation of cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase on sarcoplasmic reticulum fractions of various smooth muscles and its related novel relaxants. *Biochem. Pharmacol.* 26, 994-996 (1977).
- Kimura, I., Nakamura, T. and Kimura, M.: Alloxan-diabetic state-induced suppression of  $\text{Ca}^{2+}$  dependent slow action potentials in mouse diaphragm muscle. *Jpn. J. Pharmacol.* 47, 197-199 (1988b).
- Kimura, I., Nojima, H. and Kimura, M.: External  $\text{Ca}^{2+}$  dependence of acetylcholine- and succinylcholine-induced changes in channel conductance, open time and frequency at endplates of single muscle cells of adult mice. *Neuropharmacol.* 30, 1211-1217 (1991c).
- Kimura, M., Nojima, H., Muroi, M. and Kimura, I.: Mechanism of the blocking action of  $\beta$ -eudesmol on the nicotinic acetylcholine receptor channel in mouse skeletal muscles. *Neuropharmacol.* 30, 835-841 (1991a).
- Kimura, I., Okazaki, M., Uwano, T., Kobayashi, S. and Kimura, M.: Succinylcholine-induced acceleration and suppression of electrically evoked acetylcholine release from mouse phrenic nerve-hemidiaphragm



- muscle preparation. *Jpn. J. Pharmacol.* 57, 397-403 (1991b).
- Kimura, I., Okazaki, M. and Kimura, M.: Streptozotocin-diabetes modifies acetylcholine release from mouse phrenic nerve terminal and presynaptic sensitivity to succinylcholine. *Jpn. J. Pharmacol.* 62, 35-41 (1993).
- Kirby, M.S., Sagara, Y., Gaa, S., Inesi, G., Lederer, W.J. and Rogers, T.B.: Thapsigargin inhibits contraction and  $\text{Ca}^{2+}$  transient in cardiac cells by specific inhibition of the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  pump. *J. Biol. Chem.*, 267, 12545-12551 (1992).
- Kistler, J., Stroud, R.M., Klymkowsky, M.W., Lalancette, R.A. and Fairclough, R.H.: Structure and function of an acetylcholine receptor. *Biophys. J.* 37, 371-383 (1982).
- Kobayashi, S., Fujihara, M., Hoshino, N., Kimura, I. and Kimura, M.: Diabetic state-induced activation of calcium-activated neutral proteinase in mouse skeletal muscle. *Endocrinol. Japon.* 36, 833-844 (1989).
- Labarca, P., Lindstrom, J. and Montal, M.: Acetylcholine receptor in planar lipid bilayers. *J. Gen. Physiol.* 83, 473-496 (1984).
- Lambert, D.H. and Parsons, R.L.: Influence of polyvalent cations on the activation of muscle endplate receptors. *J. Gen. Physiol.* 56, 309-321 (1970).
- Lambert, J.J., Durant, N.N. and Henderson, E.G.: Drug-induced modification of ionic conductance at the neuromuscular junction. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23, 505-539 (1983).
- Laufer, R. and Changeux, J.-P.: Calcitonin gene-related peptide elevates cyclic AMP levels in chick skeletal muscle: possible neurotrophic role for a coexisting neuronal messenger. *EMBO J.* 6, 901-906 (1987).
- Lee, S.L. and Dhalla, N.S.:  $\text{Ca}^{2+}$ -channels and adrenoceptors in diabetic skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 353-358 (1992).
- Li, L. and McNamee, M.G.: Modulation of nicotinic acetylcholine receptor channel by pH: a difference in pH sensitivity of Torpedo and mouse receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Cell. Mol. Neurobiol.* 12, 83-93 (1992).
- Lu, B., Fu, W.-m., Greengard, P. and Poo, M.-m.: Calcitonin gene related

- peptide potentiates synaptic responses at developing neuromuscular junction. *Nature* 363, 76-79 (1993).
- Lytton, J., Westlin, M. and Hanley, M.R.: Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J. Biol. Chem.*, 266, 17067-17071 (1991).
- Magazanik, L.G. and Vyskocil, F.: Dependence of acetylcholine desensitization on the membrane potential of frog muscle fibre and on the ionic changes in the medium. *J. Physiol.* 210, 507-518 (1970).
- Magazanik, L.G. and Vyskocil, F.: The effect of temperature on desensitization kinetics at the post-synaptic membrane of the frog muscle fibre. *J. Physiol.* 249, 285-300 (1975).
- Magleby, K.L. and Palotta, B.S.: A study of desensitization of acetylcholine receptors using nerve-related transmitter in the frog. *J. Physiol.* 316, 225-250 (1981).
- Manthey, A.A.: Further studies of the effect of calcium on the time course of action of carbamylcholine and the neuromuscular junction. *J. Gen. Physiol.* 56, 407-419 (1970).
- Matsui, T., Kimura, I. and Kimura, M.: Increase in the activities of plasma pseudocholinesterase dependent on the blood glucose level and its relation to the hypersensitivity to acetylcholine in striated muscles of KK-CA<sup>y</sup> mice with diabetes. *Jpn. J. Pharmacol.* 54, 97-103 (1990).
- Matsumoto, N., Wang, X.-B. and Uchida, S.: Different natures of supersensitivity of adenylate cyclase stimulated by calcitonin gene-related peptide and isoproterenol in rat diaphragm after denervation and reserpine treatment. *J. Neurochem.* 58, 357-361 (1992).
- Medrano, S., Ochoa, E.L.M. and McNamee, M.G.: The effect of amantadine on nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) in reconstituted membranes. *Neurochem. Int.* 11, 175-181 (1987).
- Merlie, J.P., Sebbane, R., Tzartos, S. and Lindstrom, J.: Inhibition of glycosylation with tunicamycin blocks assembly of newly synthesized acetylcholine receptor subunits in muscle cells. *J. Biol. Chem.* 257, 2694-2701 (1982).
- Miledi, R.: Intracellular calcium and desensitization of acetylcholine



- receptors. *Proc. R. Soc. Lond. B* 209, 447-452 (1980).
- Miledi, R., Parker, I. and Schalow, G.: Transmitter induced calcium entry across the post-synaptic membrane at frog end-plates measured using arsenazo III. *J. Physiol.*, 300, 197-212 (1980).
- Miles, K., Greengard, P. and Huganir, R.L.: Calcitonin gene-related peptide regulates phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor in rat myotubes. *Neuron* 2, 1517-1524 (1989).
- Milne, R.J. and Byrne, J.H.: Effects of hexamethonium and decamethonium on end-plate current parameters. *Mol. Pharmacol.* 19, 276-281 (1981).
- 三品昌美.: ニコチン性アセチルコリン受容体の構造と機能. *生化学* 58, 1275-1291 (1986).
- Mishina, M., Kurosaki, T., Tobimatsu, T., Morimoto, Y., Noda, M., Yamamoto, T., Terao, M., Lindstrom, J., Takahashi, T., Kuno, M. and Numa, S.: Expression of functional acetylcholine receptor from cloned cDNAs. *Nature* 307, 604-608 (1984).
- Mishina, M., Takai, T., Imoto, K., Noda, M., Takahashi, T., Numa, S., Methfessel, C. and Sakmann, B.: Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* 321, 406-411 (1986).
- Molenaar, P.C.: Synaptic adaptation in diseases of the neuromuscular junction. *Prog. Brain Res.* 84, 145-149 (1990).
- Mulle, C., Benoit, P., Pinset, C., Roa, M. and Changeux, J.-P.: Calcitonin gene-related peptide enhances the rate of desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor in cultured mouse muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5728-5732 (1988).
- Mulle, C., Choquet, D., Korn, H. and Changeux, J.-P.: Calcium influx through nicotinic receptor in rat central neurons: its relevance to cellular regulation. *Neuron* 8, 135-143 (1992).
- Muroi, M., Tanaka, K., Kimura, I. and Kimura, M.:  $\beta$ -Eudesmol (a main component of *atractylodes lancea*)-induced potentiation of depolarization neuromuscular blockade in diaphragm muscles of normal and diabetic mice. *Jpn. J. Pharmacol.* 50, 69-71 (1989).
- Murphy, R.L.W. and Smith, M.E.: Effects of diacylglycerol and phorbol ester on acetylcholine release and action at the neuromuscular

- junction in mice. *Br. J. Pharmacol.* 90, 327-334 (1987).
- Nakagawa, M., Kobayashi, S., Kimura, I. and Kimura, M.: Diabetic state-induced modification of Ca, Mg, Fe and Zn content of skeletal, cardiac and smooth muscles. *Endocrinol. Japon.* 36, 795-807 (1989).
- Nastuk, W.L. and Parsons, R.L.: Factors in the inactivation of postjunctional membrane receptors of frog skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 56, 218-249 (1970).
- Neher, E. and Sakmann, B.: Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260, 779-802 (1976).
- Neubig, R.R., Boyd, N.D. and Cohen, J.B.: Conformations of Torpedo acetylcholine receptor associated with ion transport and desensitization. *Biochemistry* 21, 3460-3467 (1982).
- Nelson, N., Anholt, R., Lindstrom, J. and Montal, M.: Reconstitution of purified acetylcholine receptors with functional ion channels in planar lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3057-3061 (1980).
- Nishizuka, Y.: The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 308, 693-698 (1984).
- Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Kikuyotani, S., Furutani, Y., Hirose, T., Takashima, K., Inayama, S., Miyata, T. and Numa, S.: Structural homology of Torpedo californica acetylcholine receptor subunits. *Nature* 302, 528-532 (1983).
- Nojima, H., Kimura, I. and Kimura, M.: The evidence of accelerative interaction between cyclic AMP-dependent protein kinase and external calcium for the desensitization of nicotinic acetylcholine receptor channels in mouse skeletal muscle cells. *Neurosci. Lett.* (in press) (1994).
- Nojima, H., Muroi, M., Kimura, I. and Kimura, M.: Indirect inhibitory effect of succinylcholine on acetylcholine-activated channel activities and its modulation by external  $Ca^{2+}$  in mouse skeletal muscles. *Br. J. Pharmacol.* 105, 23-26 (1992).
- 野元裕, 永木康弘, 林恭三.: アセチルコリン受容体の糖鎖の神経毒との結合における役割. *生化学* 58, 845P (1986).
- Nomoto, H., Takahashi, N., Nagaki, Y., Endo, S., Arata, Y., and Hayashi,



- K.: Carbohydrate structure of acetylcholine receptor from *Torpedo californica* and distribution of oligosaccharides among the subunits. *Eur. J. Biochem.* 157, 233-242 (1986).
- Ochoa, E.L.M., Li, L. and McNamee, M.G.: Desensitization of central cholinergic mechanisms and neuroadaptation to nicotine. *Mol. Neurobiol.* 4, 251-287 (1992).
- Ochoa, E.L.M., Chattopadhyay, A. and McNamee, M.G.: Desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor: Molecular mechanisms and the effect of modulators. *Cell. Mol. Neurobiol.* 9, 141-178 (1989).
- Ohizumi, Y., Minoshima, S., Takahashi, M., Kajiwar, A., Nakamura, H. and Kobayashi, J.: Geographutoxin II, a novel peptide inhibitor of Na channels of skeletal muscles and autonomic nerves. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 239, 243-248 (1986).
- Ohmori, H.: Mechanical stimulation and Fura-2 fluorescence in the hair bundle of dissociated hair cells of the chick. *J. Physiol.* 399, 115-137 (1988).
- 岡田大助, 杉山博之: アラキドン酸と海馬シナプスの長期増強. *生体の科学* 41, 477-482 (1990)
- Oswald, R.E.: Effects of calcium on the binding of phencyclidine to acetylcholine receptor-rich membrane fragments from *Torpedo californica* electroplaque. *J. Neurochem.* 41, 1077-1084 (1983).
- Palma, A., Li, L., Chen, X., Pappone, P. and McNamee, M.: Effects of pH on acetylcholine receptor function. *J. Membrane Biol.* 120, 67-73 (1991).
- Pappone, P.A. and Barchfeld, G.L.: Modifications of single acetylcholine-activated channels in BC3H-1 cells. *J. Gen. Physiol.* 96, 1-22 (1990).
- Parsons, R.L.: Changes in postjunctional receptors with decamethonium and carbamylcholine. *Am. J. Physiol.* 217, 805-811 (1969).
- Parsons, R.L., Cochrane, D.E. and Schnitzler, R.M.: End-plate desensitization, Specificity of calcium. *Life Sci.* 13, 459-465 (1973).
- Pitchford, S., Day, J.W., Gordon, A. and Mochly-Rosen, D.: Nicotinic acetylcholine receptor desensitization is regulated by activation-induced extracellular adenosine accumulation. *J. Neurosci.* 12, 4540-4544 (1992).
- Popper, P. and Micevych, P.E.: Localization of calcitonin gene-related

- peptide and its receptors in a striated muscle. *Brain Res.* 496, 180-186 (1989).
- Poyner, D.R., Andrew, D.P., Brown, D., Bose, C. and Hanley, M.R.: Pharmacological characterization of a receptor for calcitonin gene-related peptide on rat, L6 myocytes. *Br. J. Pharmacol.* 105, 441-447 (1992).
- Rafferty, M.A., Hunkapiller, M.W., Strander, C.D. and Hood, L.E.: Acetylcholine receptor: Complex of homologous subunits. *Science* 208, 1454-1457 (1980).
- Rang, H.P. and Ritter, J.M.: On the mechanism of desensitization at cholinergic receptors. *Mol. Pharmacol.* 6, 357-382 (1970).
- Richter, E.A., Cleland, P.J.F., Rattigan, S. and Clark, M.G.: Contraction-associated translocation of protein kinase C in rat skeletal muscle. *FEBS Lett.* 217, 232-236 (1987).
- Ross, A., Rapuano, M. and Prives, J.: Induction of phosphorylation and cell surface redistribution of acetylcholine receptors by phorbol ester and carbamylcholine in cultured chick muscle cells. *J. Cell Biol.* 107, 1139-1145 (1988).
- Ruegg, U.T. and Burgess, G.M.: Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol. Sci.* 10, 218-220 (1989).
- Safran, A., Eisenberg, R.S., Neumann, D. and Fuchs, S.: Phosphorylation of the acetylcholine receptor by protein kinase C and identification of the phosphorylation site within the receptor  $\delta$ -subunit. *J. Biol. Chem.* 262, 10506-10510 (1987).
- Sakaguchi, M., Inaishi, Y., Kashiwara, Y. and Kuno, M.: Release of calcitonin gene-related peptide from nerve terminals in rat skeletal muscle. *J. Physiol.* 434, 257-270 (1991).
- Sakmann, B., Patlak, J. and Neher, E.: Single acetylcholine-activated channels show burst-kinetics in presence of desensitizing concentrations of agonist. *Nature* 286, 71-73 (1980).
- Seguera, P., Wadiche, J., Dineley-Miller, K., Dani, J.A. and Patrick, J.W.: Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain : a nicotinic cation channel highly permeable to calcium.



- J. Neurosci. 13, 596-604 (1993).
- Seidler, N.W., Jona, I., Vegh, M. and Martonosi, A.: Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem., 264, 17816-17823 (1989).
- Shaker, N., Eldefrawi, A.T., Aguayo, L.G., Warnick, J.E., Albuquerque, E.X. and Eldefrawi, M.E.: Interactions of d-tubocurarine with the nicotinic acetylcholine receptor/channel molecule. J. Pharmacol. Exp. Ther. 220, 172-177 (1982).
- 渋谷克栄, 岡田大助: LTD の分子メカニズム: 一酸化窒素の役割. 生体の科学 41, 468-472 (1990).
- 柴輝男, 井口登与志, King, G.L.: 高血糖とCキナーゼの活性化. 実験医学 9, 554-558 (1991).
- Sine, S. and Taylor, P.: Local anesthetics and histamine are allosteric inhibitors of the acetylcholine receptor. J. Biol. Chem. 257, 8106-8114 (1982).
- Somogyi, G.T., Vizi, E.S., Chaudhry, I.A., Nagashima, H., Duncalf, D., Foldes, F.F. and Goldiner, P.L.: Modulation of stimulation-evoked release of newly formed acetylcholine from mouse hemidiaphragm preparation. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 336, 11-15 (1987).
- Standaert, F.G. and Adams, J.E.: The actions of succinylcholine on the mammalian motor nerve terminal. J. Pharmacol. Exp. Ther. 149, 113-123 (1965).
- Stanley, E.F. and Drachman, D.B.: Botulinum toxin blocks quantal but not non-quantal release of ACh at the neuromuscular junction. Brain Res. 261, 172-175 (1983).
- Sunshine, C. and McNamee, M.G.: Lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function: the role of neutral and negatively charged lipids. Biochim. Biophys. Acta 1108, 240-246 (1992).
- Taira, Y., Hata, T., Ganguly, P.K., Elimban, V. and Dhalla, N.S.: Increased sarcolemmal  $\text{Ca}^{2+}$  transport activity in skeletal muscle of diabetic rats. Am. J. Physiol. 260, E626-E632 (1991).
- Takai, T., Noda, M., Mishina, M., Shimizu, S., Furutani, Y., Kayano, T., Ikeda, T., Kubo, T., Takahashi, H., Takahashi, T., Kuno, M. and Numa, S.: Cloning, sequencing and expression of cDNA for a novel subunit of

- acetylcholine receptor from calf muscle. *Nature* 315, 761-764 (1985).
- Takami, K., Kawai, Y., Shiosaka, S., Lee, Y., Girgis, S., Hillyard, C.J., NacIntyre, I., Emson, P.C. and Tohyama, M.: Immunohistochemical evidence for the coexistence of calcitonin gene-related peptide- and choline acetyltransferase-like immunoreactivity in neurons of the rat hypoglossal, facial and ambiguous nuclei. *Brain Res.* 328, 386-389 (1985).
- Takeuchi, A. and Takeuchi, N.: On the permeability of end-plate membrane during the action transmitter. *J. Physiol.* 154, 52-67 (1960).
- Takeyasu, K., Udgaonkar, J.B. and Hess, G.P.: Acetylcholine receptor: Evidence for a voltage-dependent regulatory site for acetylcholine. Chemical kinetic measurements in membrane vesicles using a voltage clamp. *Biochemistry* 22, 5973-5978 (1983).
- Thastrup, O., Cullen, P.J., Drobak, B.K., Hanley, M.R. and Dawson, A.P.: Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular  $Ca^{2+}$  stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2466-2470 (1990).
- Thesleff, S.: The mode of neuromuscular block caused by acetylcholine, nicotine, decamethonium and succinylcholine. *Acta Physiol. Scand.* 34, 218-231 (1955).
- Tokumitsu, H., Chijiwa, T., Hagiwara, M., Mizutani, A., Terasawa, M. and Hidaka, H.: KN-62, 1-[N,0-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine, a specific inhibitor of  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.* 265, 4315-4320 (1990).
- Udgaonkar, J.B. and Hess, G.P.: Isosteric regulation of the acetylcholine receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 8, 190-192 (1987).
- Verino, S., Amador, M., Leutje, C.W., Partrick, J. and Dani, J.A.: Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron* 8, 127-134 (1992).
- Unwin, N., Toyoshima, C. and Kubalec, E.: Arrangement of the acetylcholine receptor subunits in the resting and desensitized states, determined by cryoelectron microscopy of crystallized Torpedo postsynaptic membranes. *J. Cell Biol.* 107, 1123-1138 (1988).
- Wagoner, K. and Palotta, B.S.: Modulation of acetylcholine receptor



- desensitization by forskolin is independent of cAMP. *Science* 240, 1655-1657 (1988).
- Wessler, I., Halank, M., Rasback, J. and Kilbinger, H.: Presynaptic nicotine receptors mediating a positive feed-back on transmitter release from the rat phrenic nerve. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 334, 365-372 (1986).
- Wilson, D.F. and Thomsen, R.H.: Nicotinic receptors on the rat phrenic nerve: evidence for negative feedback. *Neurosci. Lett.* 132, 163-166 (1991).
- Witzemann, V., Barg, B., Nishikawa, Y., Sakmann, B. and Numa, S.: Differential regulation of muscle acetylcholine receptor  $\gamma$ - and  $\epsilon$ -subunit mRNAs. *FEBS Lett.* 223, 104-112 (1987).
- Worley, P.F., Baraban, J.M., Supattapone, S., Wilson, V.S. and Snyder, S.H.: Characterization of inositol triphosphate receptor binding in brain: regulation by pH and calcium. *J. Biol. Chem.*, 262, 12132-12136 (1987).
- Yoshihara, Y. and Watanabe, Y.: Translocation of phospholipase A<sub>2</sub> from cytosol to membranes in rat brain induced by calcium ions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170, 484-490 (1990).
- Young, E.F., Ralston, E., Blake, J., Ramachandran, J., Hall, Z.W. and Stroud, R.M.: Topological mapping of acetylcholine receptor: Evidence for a model with five transmembrane segments and a cytoplasmic COOH-terminal peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 626-630 (1985).
- Zani, B.N., Grassi, F., Molinaro, M., Monaco, L. and Eusebi, F.: Cyclic AMP regulates the life time of acetylcholine-activated channels in cultured myotubes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 140, 243-249 (1986).

## 付録 1 . 略 語

ACh	: acetylcholine
cAMP	: cyclic adenosine monophosphate
cDNA	: complementary desoxyribonucleic acid
CGRP	: calcitonin gene-related peptide
G	: GTP-binding
GTP	: guanosine triphosphate
IC <sub>50</sub>	: 50 % inhibitory concentration
mRNA	: messenger ribonucleic acid
n-ACh	: nicotinic acetylcholine
PKA	: protein kinase A
PKC	: protein kinase C
PLA <sub>2</sub>	: phospholipase A <sub>2</sub>
RAMIC	: receptor-activity modulating intracellular calcium
S.E.	: standard error
STZ	: streptozotocin
SuCh	: succinylcholine (suxamethonium)

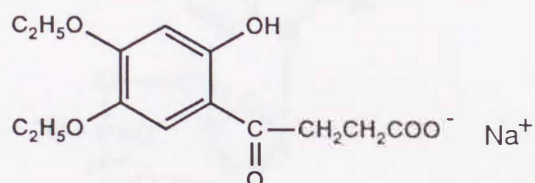


## 付録 2 . 試薬リスト

AA373 (武田薬品)

$C_{14}H_{17}O_6Na$

304.28



actylcholine·Cl (Nacalai Tesque)

$C_7H_{16}ClNO_2$

$CH_3COOCH_2CH_2N^+(CH_3)_3 \cdot Cl^-$

181.68

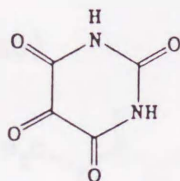
aequorin (Mayo Clinic, Dr. Blinks, J.R., 和光純薬)

ca. 20,000

alloxan·H<sub>2</sub>O (Nacalai Tesque)

$C_4H_2N_2O \cdot H_2O$

160.09



4-aminipyridine (Nacalai Tesque)

$C_5H_6N_2$

94.11



botulinum toxin (和光純薬)

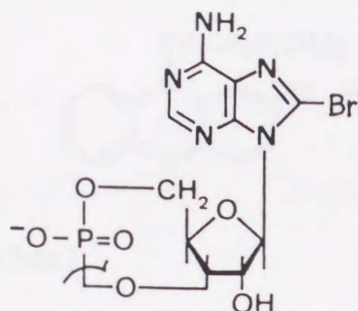
type A

ca. 500,000

8-bromo cyclic AMP (Sigma)

$C_{10}H_{10}BrN_5O_6PNa$

430.1



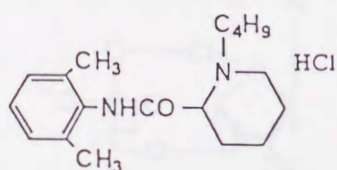
$\alpha$ -bungarotoxin (Biotoxin)

ca. 8,000

bupivacaine·HCl (藤沢)

$C_{18}H_{28}N_2O \cdot HCl$

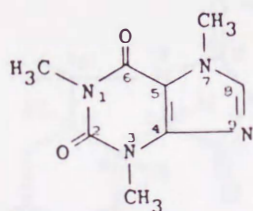
324.89



caffeine·H<sub>2</sub>O (Nacalai Tesque)

$C_8H_{10}N_4O_2 \cdot H_2O$

212.21



calcitonin gene-related peptide (旭化成)

human  $\alpha$

3789.33

calcitonin gene-related peptide (8-37) (Peninsula.Lab.)

human

3123.73

calmodulin (Calbiochem)

ウシ脳

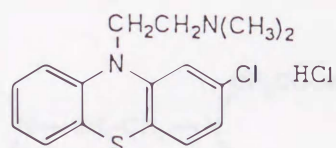
16,723



chlorpromazine·HCl (Nacalai Tesque)

$C_{17}H_{19}ClN_2S \cdot HCl$

355.34



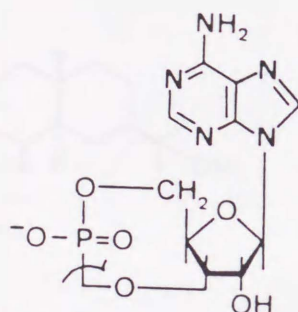
cholera toxin (Calbiochem)

ca. 84,000

cyclic AMP (Sigma)

$C_{10}H_{12}N_5O_6P$

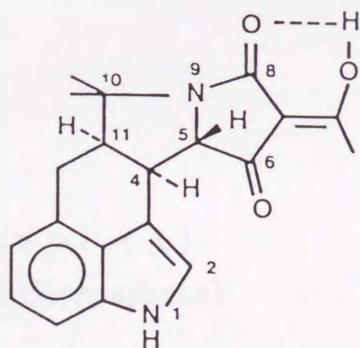
329.2



cyclopiazonic acid (Sigma)

$C_{20}H_{20}N_2O_3$

336.4



decamethonium (和光純薬)

$C_{16}H_{38}Br_2N_2$

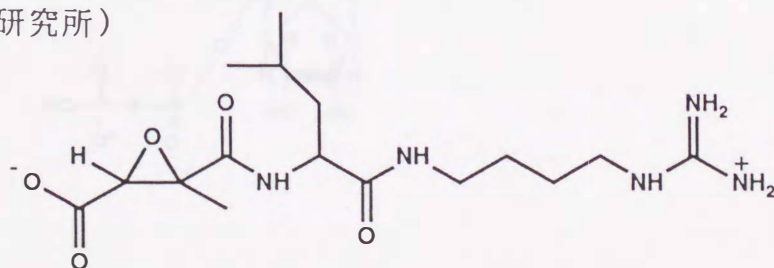
$(CH_3)_3N^+(CH_2)_{10}N^+(CH_3)_3 \cdot 2Br^-$

418.30

E-64 (ペプチド研究所)

$C_{15}N_5H_{27}O_5$

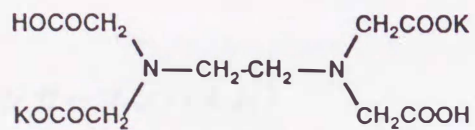
357.41



EDTA・2K (和光純薬)

$C_{10}H_{14}N_2O_8K_2 \cdot 2H_2O$

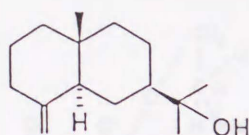
404.46



$\beta$ -eudesmol (富山医科薬科大学 上野照子薬学修士)

$C_{15}H_{26}O$

222.37



formamide (和光純薬)

$CH_3NO$

45.05

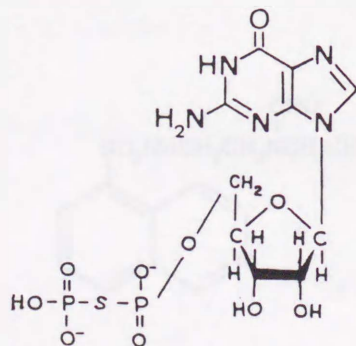
$CH_3NO$

GDP  $\beta$  S (ベーリンガー・マンハイム)

guanosine-5'-O-(2-thiodiphosphate)

$C_{10}H_{12}N_5O_{10}P_2SLi_3$

477.0





geographutoxin II (ペプチド研究所)

$C_{101}H_{181}N_{39}O_{30}S_7$

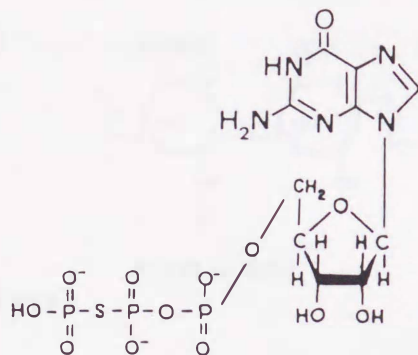
2646.2

GTP  $\gamma$  S (ベーリンガーマンハイム)

guanosine-5'-O-(3-thiotriphosphate)

$C_{10}H_{12}N_5O_{13}P_3SLi_4$

477.0

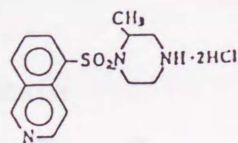


H-7 (MBL)

1-(5-isoquinolinesulphonyl)-2-methylpiperazine dihydrochloride

$C_{14}H_{17}N_3O_2S \cdot 2HCl$

364.3

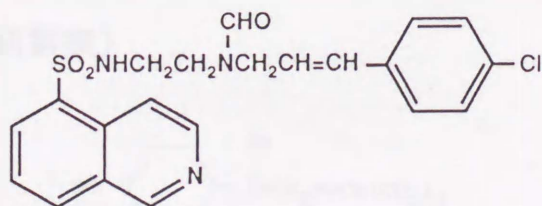


H-85 (名古屋大学 日高弘義教授)

*N*-[2-(*N*-formyl-*p*-chlorocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulphonamide

$C_{21}H_{20}ClN_2O_3S$

429.5

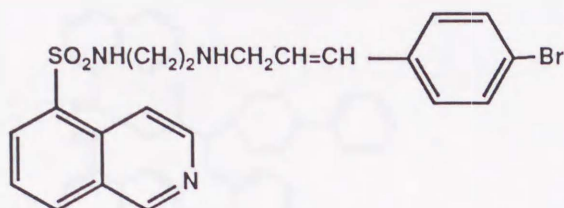


H-89 (名古屋大学 日高弘義教授)

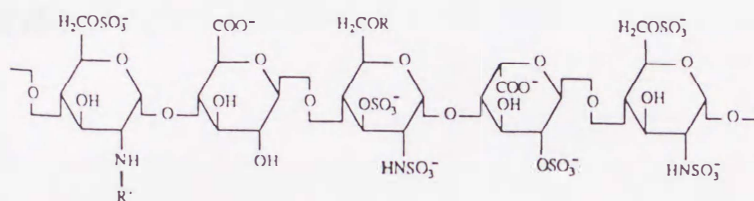
*N*-[2-(*P*-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulphonamide

$C_{20}H_{20}BrN_2O_2S$

446.0



heparin (Sigma)



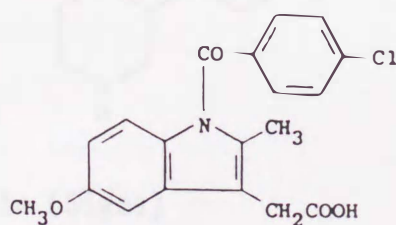
$R = H \text{ or } SO_3^-$

$R' = SO_3^- \text{ or } COCH_3$

indomethacin (Sigma)

$C_{19}H_{16}ClNO_4$

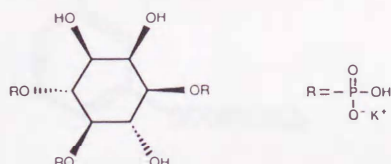
357.81



inositol 1,4,5-triphosphate

$C_6H_{12}O_{15}P_3K_3$

534.37



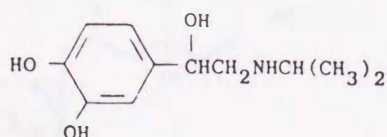
insulin (Sigma)

(Novo, ultralente)

isoproterenol (科研製薬)

$C_{11}H_{17}NO_3 \cdot HCl$

247.71



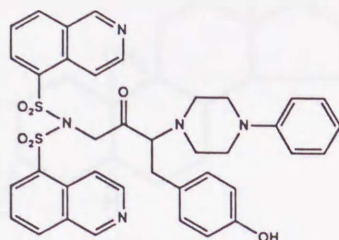


KN-62 (名古屋大学 日高弘義教授)

1-[*N*,*O*,-bis(5-isoquinolinesulphonyl)-*N*-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine

$C_{38}H_{35}H_5S_2O_6$

721.0



leupeptine (ペプチド研究所)

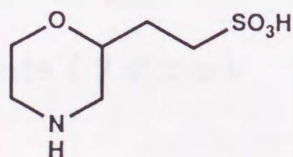
426.56

Mes (Sigma)

2-[*N*-morpholino]ethanesulfonic acid

$C_6H_{13}NO_4S$

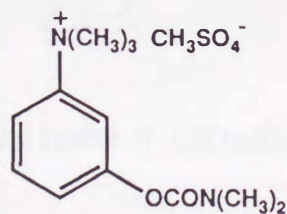
195.2



neostigmine methylsulfate (Sigma)

$C_{12}H_{19}N_2O_2 \cdot CH_3SO_4$

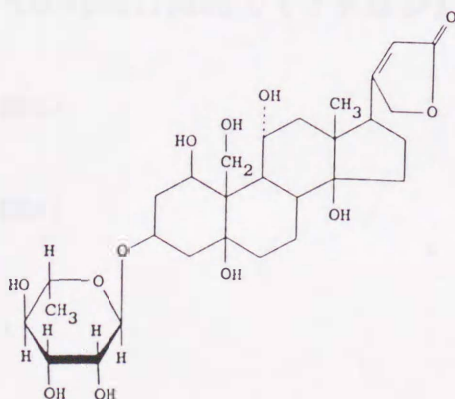
334.4



ouabain (メルクジャパン)

$C_{29}H_{44}O_{12}$

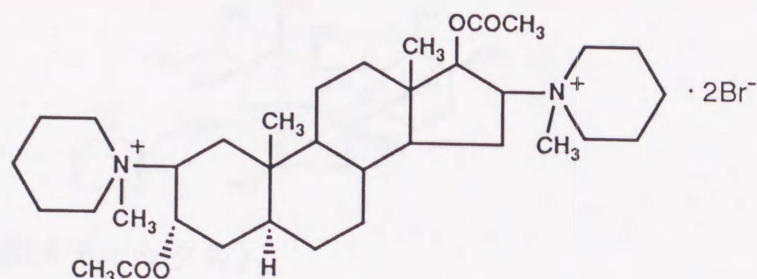
584.64



pancuronium bromide (三共)

$C_{35}H_{60}Br_2N_2O_4$

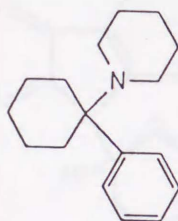
732.70



phencyclidine (Asher Kalir, Ph. D., Tel Aviv University)

$C_{17}H_{25}N$

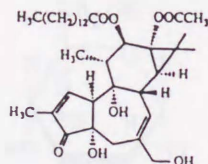
243.38



4 $\alpha$ -phorbol 12,13-didecanoate (フナコシ)

$C_{40}H_{64}O_8$

672.95



phosphatidylcholine-phospholipase C (富山医薬大 三井健一郎助教授)

phosphatidylcholine-phospholipase C-antibody (富山医薬大 三井健一郎助教授)

phosphatidylinositol-phospholipase C (フナコシ)

phospholipase A<sub>2</sub> (Sigma)

protein kinase A (Sigma)

catalytic subunit

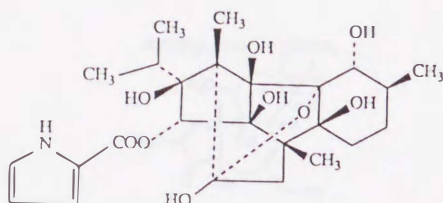
ca. 40,000



ryanodine (Nacalai Tesque)

$C_{25}H_{35}NO_9$

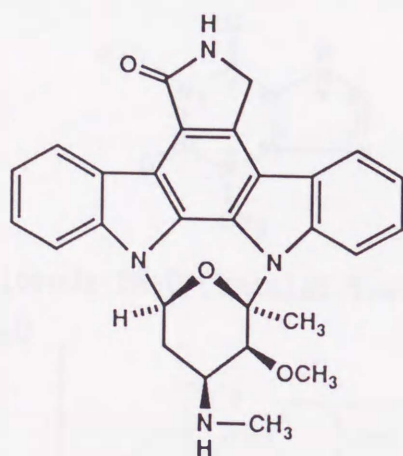
493.54



staurosporine (協和メディックス)

$C_{28}H_{26}N_4O_3$

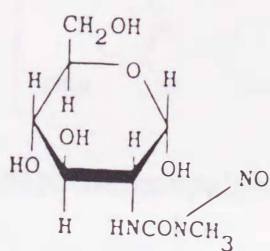
466



streptozotocin (Sigma)

$C_8H_{15}N_3O_7$

265.22



succinylcholine chloride·2H<sub>2</sub>O (Nacalai Tesque)

$C_{14}H_{30}Cl_2N_2O_4 \cdot 2H_2O$

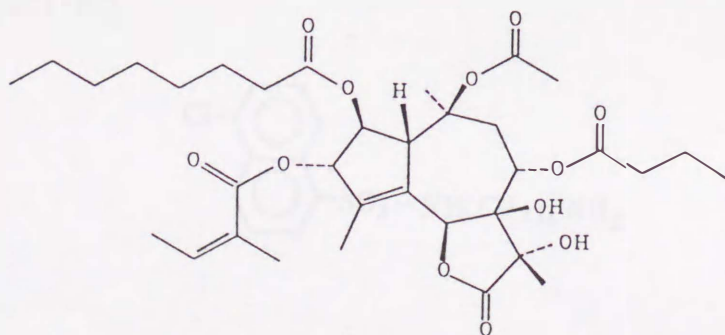
$(CH_3)_3N^+CH_2OOCCH_2CH_2COOCH_2N^+(CH_3)_3 \cdot 2Cl^- \cdot 2H_2O$

397.34

thapsigargin (Sigma)

$C_{34}H_{50}O_{12}$

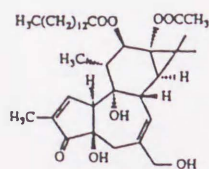
650.8



12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate (Sigma)

$C_{36}H_{56}O_8$

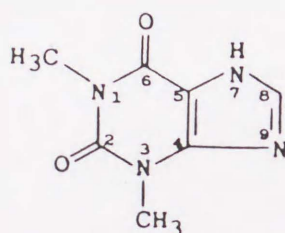
616.8



theophylline (Nacalai Tesque)

$C_7H_8N_4O_2 \cdot H_2O$

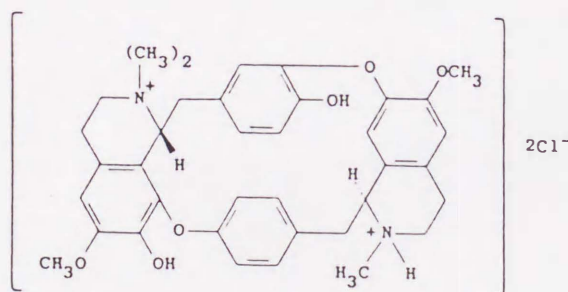
198.19



(+)-tubocurarine chlorode  $\cdot 2H_2O$  (Nacalai Tesque)

$C_{37}H_{42}Cl_2N_2O_6 \cdot 2H_2O$

762.73

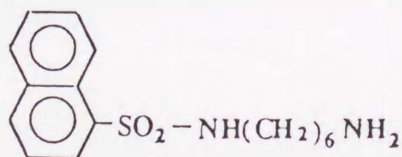


W-5 (MBL)

N-(6-aminohexyl)-1-naphthalenesulphonamide hydrochloride

$C_{16}H_{22}N_2O_2S \cdot HCl$

342.88



W-7 (Nacalai Tesque)

N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulphonamide hydrochloride

$C_{16}H_{21}N_2O_2SCl \cdot HCl$

377.33

